

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Efecto del salubrinal sobre la formación de la cicatriz glial tras una
lesión en el sistema nervioso central**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Asunción de la Barreda Manso

Directores

Lorenzo Romero Ramírez
Manuel Nieto Sampedro

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**EFFECTO DEL SALUBRINAL SOBRE LA FORMACIÓN DE
LA CICATRIZ GLIAL TRAS UNA LESIÓN EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL**

Tesis Doctoral
M^a Asunción de la Barreda Manso
Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



EFFECTO DEL SALUBRINAL SOBRE LA FORMACIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL TRAS UNA LESIÓN EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Memoria presentada por
M^a Asunción de la Barreda Manso
para optar al grado de Doctora

V^o B^o de los directores:
Dr. Lorenzo Romero Ramírez
Dr. Manuel Nieto Sampedro

Don Lorenzo Romero Ramírez, Investigador de la Unidad de Neurología Experimental del Hospital Nacional de Parapléjicos perteneciente al SESCAM, y Don Manuel Nieto Sampedro, Profesor de Investigación del Instituto Cajal, perteneciente al CSIC,

CERTIFICAN:

Que Doña M^a Asunción de la Barreda Manso, siendo Licenciada en Biología y Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, ha realizado el presente trabajo de investigación bajo nuestra dirección, correspondiente a su Tesis Doctoral titulada: “Efecto del Salubrinal sobre la formación de la cicatriz glial tras una lesión en el Sistema Nervioso Central”.

Una vez revisada, consideramos que dicha memoria reúne todos los requisitos necesarios para ser sometida a juicio de la Comisión correspondiente, por lo que autorizamos su presentación.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos este documento.

Dr. Lorenzo Romero Ramírez

Prof. Manuel Nieto Sampedro

Madrid, 2015

A mis padres

He probado el vértigo de arriesgar
y la placidez de no moverme.

Prefiero el vértigo, la vida, el riesgo.

Agradecimientos

Recuerdo el día en que conocí al Dr. Manuel Nieto Sampedro. Yo era una recién llegada a este mundo científico y, lo que más me impresionó de él, fue la gran admiración y respeto que le tenían sus colegas. Unos meses después entraba en su laboratorio, con unas ganas inmensas de comerme el mundo. Gracias Manuel por darme esta oportunidad, por compartir tu gran sabiduría científica, por enseñarme a crecer, a ser crítica y a ver que siempre, siempre podemos mejorar. Gracias por considerarme “tu reina”. Y gracias por regalarme a Lorenzo. Durante estos años has sido para mí como un hermano mayor y, aunque a veces has querido, no sin razón, mandarme a la luna, “a la luna sin oxígeno”, has dedicado con gusto mucho tiempo a “tu primer pollito”. Juntos hemos soñado, evolucionado y pasado tan buenos momentos, que nunca los olvidaré. Gracias por todos ellos. Gracias por creer en mí.

Me siento una privilegiada por haber pasado tantas horas haciendo algo que me apasiona. Y en eso han contribuido todas las personas que han formado y forman parte del B-21 y su evolución al C-17. Gracias a Diego, Bea, Jesús, Vilma, Estela,... Pero sobre todo gracias a Natalia que, aunque llegaste un poquito después que yo, siento que siempre has estado acompañándome. Gracias por nuestros momentos de risas, de desesperación, de apoyo, de locuras, de animalario, gracias por aprender tantas cosas juntas. Gracias por permitir convertirme en esto sin soltarme la mano. Pero una no pasa todo el día encerrada en su laboratorio, y menos una persona tan, tan inquieta como yo. Gracias al C-05 que siempre me habéis acogido con los brazos abiertos. Gracias a Carmen, Laura, Fran, Ana y, en especial, a Miriam, que has traspasado esa barrera y no sé qué habría hecho sin ti todos estos años, sin nuestras confidencias. Gracias a Gabi, por ese punto de inflexión y cambiar el libro por unos “compis” de comida. Gracias a los que habéis formado parte de mi Cajal: a Ana, Paula, Elisa... Y gracias a todos los que me habéis facilitado el llegar hasta aquí, en especial a Fide y Laude, que habéis cuidado tanto “mi vida cultivada y ratonil”.

Yo no me habría lanzado a la piscina tesil sin mi mundo toledano. Gracias por hacerme ver que tenía un gusanillo dentro llamado ciencia. Gracias a los NRML, los GNPM, gracias a Rodrigo y Manolo por brindarme en bandeja esta oportunidad. Sin vosotros, hoy no estaría aquí. Y un GRACIAS (sí, en mayúsculas) a Marcos. Por mucha distancia que nos separe, siempre te siento cerca, pipeteando a mi lado. Me has enseñado que para hablar sólo hace falta mirarnos. Gracias por formar parte de mi vida. Nunca se me pasará el quererte y el “mono” de querer verte.

No sería nadie sin todas esas personas que me rodean. Y hay muchas que, sin imponérselo la vida, han decidido formar una barrera protectora a mi alrededor para evitar que me desmorone. Ay!!! Locos!!!! Tranquilos, como diría Lewis Carroll en *Alicia en el país de las maravillas*: “estás loco, pero te diré un secreto: las mejores personas lo están”. Gracias a mis criptaneses, Lourdes y Rosa, porque me hacéis volver a los orígenes siempre que nos vemos. Gracias a los de la “facult”: a Carmen, Gonzalo, Pablo, Sergio y, en especial, a Clara y Roci, junto con ese gran regalo llamado Lucas. Juntas siempre seremos “las 3 marías” y nos comeremos el mundo. Gracias a ese gran pack Luz y Almu, porque las cenas con vosotras pueden ser eternamente divertidas. Gracias a Rubén, porque siempre estás dispuesto a ser nuestro compañero más loco en todo lo que hacemos “tus little Barreda”. Gracias a todos los que forman Adhara. Con vosotros aprendí a ser mejor persona, a sonreír ante las dificultades, a valorar mi vida como si no hubiese un mañana, y a descubrir en la sierra esa gran amante que nunca me defrauda. Gracias en especial a Ana, por acompañarme en “el camino” de la vida y por hacerme ver que los abrazos son el mejor regalo que puedes dar y te pueden dar. Gracias a los Borja: a Ana, Bea, Ana, Elena,... porque gracias a vosotros recibo toda la paz que necesito. Gracias en especial a Jaime, que sabes sacarme una sonrisa siempre, tanto en los buenos momentos como en los no tan buenos. Gracias por hacer mella poco a poco. No sé qué habría hecho sin ti estos últimos meses. Gracias por sostenerme.

Aunque no pudieron elegir el conocerme, no por eso han dejado nunca de apoyarme, de quererme. La mía sí que es una gran, gran familia. A ellos les debo tantas cosas... Gracias por ayudarme a crecer, a descubrirme. Gracias a Txistu, cuya sola presencia engrandecía mi alma. Gracias a mis hermanos, porque todos y cada uno de vosotros me aportáis algo diferente, sin lo que yo hoy no sería como soy. Gracias por aguantar mis piradas de pinza científicas. Gracias a “las madrileñas”, porque habéis sido mi pilar todos estos años. GRACIAS a Mariarro, Ana, Mariapi, Moncho, Pepe, Tere y Beti. Gracias a mi madre, mi gran admiradora, porque para ti siempre seré “una investigadora insigne”. Gracias por enseñarme a luchar por todo lo que quiero sin rendirme nunca. A ti tengo que acudir siempre, porque tu simple presencia me llena de energía. No habrá nunca en el mundo hilo telefónico suficientemente largo para separarnos. GRACIAS. Y gracias a mi padre. Gracias por darme tanto, tanto, tanto cariño, aunque estemos más lejos de lo que nos gustaría. Sé que cuidas de mí todos los días, horas, minutos y segundos. Cuánto me gustaría enseñarte esto y que me dices el mejor de los abrazos. Gracias por toda la vida que compartimos y que nunca olvidaré. GRACIAS.

Y, por último, gracias a mis ratoncitos. Junto a ellos he pasado momentos maravillosos y he disfrutado mucho trabajando. Sin ellos, todo este trabajo no hubiese sido posible. Va por ellos!!!

Índice

ABREVIATURAS	21
RESUMEN	27
ABSTRACT	31
INTRODUCCIÓN	35
1. Lesiones en el Sistema Nervioso Central	37
2. Formación de la cicatriz glial después de una lesión en el SNC	37
3. Componentes celulares de la cicatriz glial	40
3.1 Microglía	40
3.2. Fibroblastos	41
3.3. Astrocitos	42
4. Componentes moleculares de la cicatriz glial	43
5. Papel del TGF β durante la formación de la cicatriz glial	45
6. Implicación por parte de eIF2alfa en la regulación de la cicatriz glial	47
6.1. Salubrinal	49
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Material	59
1.1. Animales	59
1.2. Reactivos	59
1.2.1. Reactivos para modelos <i>in vivo</i>	59
1.2.2. Reactivos para cultivos celulares	59
1.2.3. Reactivos para biología celular	60
1.2.4. Reactivos para biología molecular	61
1.2.5. Reactivos para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica	63
1.3. Compuestos	64
1.3.1. Drogas	64
1.3.2. Plásmidos	65
1.4. Oligonucleótidos	65
1.5. Anticuerpos	66

1.5.1. Anticuerpos primarios	66
1.5.2. Anticuerpos secundarios	67
1.6. Material de laboratorio	68
1.7. Instrumentos	68
1.8. Programas informáticos	70
2. Métodos experimentales	71
2.1. Animales de experimentación	71
2.2. Cultivos celulares	71
2.2.1. Cultivo de astrocitos perinatales murinos	71
2.2.2. Cultivo de fibroblastos perinatales murinos	72
2.2.3. Cultivo de microglía perinatal de rata	72
2.2.4. Cultivo de neuronas corticales embrionarias murinas	72
2.3. Técnicas de biología celular	73
2.3.1. Determinación de la viabilidad celular por el método de reducción de MTT	73
2.3.2. Determinación de la producción de nitritos en cultivos celulares	73
2.4. Técnicas de biología molecular	74
2.4.1. Transfección transitoria y actividad de reporteros acoplados a luciferasa en cultivos de astrocitos	74
2.4.2. Determinación por electroforesis, transferencia e inmuno- detección (Western blot) de la expresión y secreción de proteínas	75
2.4.3. Evaluación por RT-qPCR de la actividad génica transcripcional	77
2.4.4. Análisis de la secreción diferencial de proteínas mediante la técnica de microarray	78
2.5. Técnicas estereológicas	79
2.5.1. Estudio del crecimiento neurítico en un modelo de cicatriz <i>in vitro</i>	79
2.6. Aproximaciones <i>in vivo</i> en un modelo de lesión en Sistema Nervioso	80
2.6.1. Modelo de cicatriz glial por lesión mecánica en la corteza cerebral y administración de Salubrinal	80
2.6.2. Estudio del efecto del Salubrinal sobre la ruta del TGFβ en una lesión lacerante de corteza cerebral del ratón transgénico SBE/tk-luc	82
2.6.3. Medida de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un modelo de cicatriz glial en la corteza cerebral de ratón	83
2.7. Técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas	84

2.7.1. Perfusión de los animales y procesamiento de muestras	84
2.7.2. Fijación de células en cultivo para inmunocitoquímica	84
2.7.3. Inmunohistoquímica	84
2.7.4. Tinción de Nissl para cuerpos neuronales	87
2.7.5. Inmunocitoquímica	87
2.7.6. Controles de especificidad del anticuerpo secundario	88
2.7.7. Obtención y procesamiento de imágenes	88
2.7.8. Cuantificación y análisis de imagen	88
2.8. Análisis estadístico	89

RESULTADOS 91

1. Análisis del efecto del Salubrinal sobre la transcripción génica, expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas de ECM inducidos por factores de crecimiento en cultivos de astrocitos	93
1.1. Efecto del Salubrinal sobre la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos	93
1.2. Efecto del Salubrinal sobre la expresión de ARNm para proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos	96
2. Evaluación del efecto del Salubrinal en un modelo <i>in vitro</i> de cicatriz glial y sus posibles efectos sobre el crecimiento neurítico	99
3. Determinación del patrón de expresión celular y espacio-temporal de la reactividad glial tras una lesión mecánica en un modelo animal de cicatriz glial. Efecto del Salubrinal sobre la reactividad glial y modulación de la cicatriz formada tras la lesión	102
3.1. Efecto del Salubrinal sobre la supervivencia neuronal en un modelo <i>in vivo</i> de lesión	103
3.2. Efecto del Salubrinal en un modelo <i>in vivo</i> de lesión con un tratamiento agudo y muerte a los 3 dpl	105
3.3. Efecto del Salubrinal en un modelo <i>in vivo</i> de lesión con un tratamiento agudo y muerte a los 21 dpl	108
3.4. Efecto del Salubrinal en un modelo <i>in vivo</i> de lesión con un tratamiento crónico y muerte a los 21 dpl	111
3.5. Efecto del Salubrinal sobre la ruta del TGF β tras una lesión	113
3.6. Posibles causas de la reactividad glial ocasionada por el Salubrinal	116
3.7. Efecto inflamatorio del Salubrinal <i>in vivo</i> : lesión y tratamiento agudo	120

3.8. Efecto fibrótico del Salubrinal en un modelo <i>in vivo</i> de lesión en un tratamiento agudo y muerte a los 3 dpl	122
3.9. Efecto del Salubrinal sobre la extravasación al parénquima nervioso en un modelo <i>in vivo</i> de lesión	124
DISCUSIÓN	127
1. El Salubrinal reduce la traducción y la transcripción de proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos	129
2. El Salubrinal rescata de la inhibición del crecimiento neurítico en un modelo <i>in vitro</i> de cicatriz glial	131
3. El Salubrinal promueve la supervivencia neuronal en un modelo de cicatriz glial	132
4. El efecto del Salubrinal sobre la reactividad glial y la producción de fibronectina varía dependiendo del tiempo de administración postlesión	133
5. El Salubrinal modula la permeabilidad de la BHE en un modelo de cicatriz glial	136
6. Efecto global del Salubrinal sobre la formación de la cicatriz glial tras una lesión en el SNC	139
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA	147
ANEXOS	167
Anexo I: Breve <i>curriculum vitae</i> de la doctoranda	169
Anexo II: Artículo original: “Salubrinal inhibits the expression of proteoglycans and favors neurite outgrowth from cortical neurons <i>in vitro</i> ”	177

Abreviaturas

4PBA: 4-fenilbutirato sódico

AP: anteroposterior

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASPAYM: asociación de lesionados medulares y grandes discapacitados físicos

ATP: adenosin trifosfato

BHE: barrera hematoencefálica

BSA: albúmina de suero bovino (del inglés: bovine serum albumin)

ColIV: colágeno tipo IV

CPF: factor de polimerización de condroitina (del inglés: chondroitin polymerase factor)

CSPGs: condroitín sulfato proteoglicanos

CTGF: factor de crecimiento de tejido conjuntivo (del inglés: connective tissue growth factor)

DAB: diaminobenzidina

DEPC: dietilpirocarbonato

DFO: deferoxamina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Media

DMSO: dimetilsulfóxido

DNasa I: desoxirribonucleasa I

dps: días postsesión

DTT: dithiothreitol

DV: dorsoventral

ECM: matriz extracelular (del inglés: extracellular matrix)

EGF: factor de crecimiento epidérmico (del inglés: epidermal growth factor)

eIF2 α : factor de iniciación de la traducción de eucariotas alfa

GCN2: quinasa control general no desreprimible 2

GFAP: proteína ácida fibrilar glial (del inglés: glial fibrillary acid protein)

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HRI: inhibidor regulado por el grupo hemo

HS: suero de caballo (del inglés: horse serum)

IFN γ : interferón γ

IL-1: interleuquina 1

IL-1 β : interleuquina 1 beta

IL-6: interleuquina 6

iNOS: enzima óxido nítrico sintasa inducible (del inglés: inducible nitric oxide synthase)

LPS: lipopolisacárido bacteriano

ML: mediolateral

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide

OMS: organización mundial de la salud

P/S: penicilina/estreptomicina

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés: platelet-derived growth factor)

PDGF-B: PDGF tipo B

PDGFR-B: receptor de PDGF-B

PERK: quinasa del retículo endoplásmico similar a PKR

PKR: proteína quinasa inducida por ARN de doble hebra

PLL: poli-L-lisina

qPCR: PCR cuantitativa (del inglés: quantitative polymerase chain reaction)

RE: retículo endoplásmico

RER: retículo endoplásmico rugoso

RPMI 16490: medio Roswell Park Memorial Institute 1640

RPS29: gen constitutivo de la proteína ribosomal S29

SARA: anclaje para la unión del receptor

SBE: elementos de unión de Smad (del inglés: smad binding elements)

SDS: dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE: SDS-PolyAcrylamide-Gel-Electrophoresis

SEM: error estándar de la media (del inglés: standard error of the mean)

SFB: suero fetal bovino

SNC: sistema nervioso central

TGFBR2: receptor de TGF β tipo 2

TGFBR1: receptor de TGF β tipo 1

TGF β : factor de crecimiento tumoral tipo beta (del inglés: transforming growth factor beta)

TNF α : factor de necrosis tumoral alfa (del inglés: tumor necrosis factor alpha)

TUDCA: tauroursodeoxicolato sódico

UDCA: ursodeoxicolato sódico

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés: vascular endothelial growth factor)

XT-I: xilosiltransferasa tipo I

XT-II: xilosiltransferasa tipo II

Resumen

Las lesiones severas del SNC representan una de las principales causas de incapacidad en países desarrollados. Tras ellas, en el tejido lesionado ocurren dos procesos cronológicamente secuenciales. El primero es la muerte neuronal primaria y la axotomía de las neuronas presentes en la zona lesionada. El segundo es la muerte neuronal secundaria debido a la degeneración de las neuronas producida por el conjunto de procesos bioquímicos que están sucediendo en la zona de lesión y al microambiente proinflamatorio inhibitorio de la regeneración. Las células de microglía modifican su morfología, pasan a estado reactivo y se acercan a la zona lesionada. Expresan moléculas proinflamatorias, cuyo objetivo es eliminar las células dañadas y las sustancias tóxicas. Todo ello desencadena una rápida respuesta inflamatoria, inicialmente necesaria, pero que si se alarga en el tiempo, es perjudicial porque aumenta el daño neuronal secundario.

Para limitar el paso de sustancias y células procedentes de los vasos sanguíneos al tejido nervioso, los astrocitos y las células mesenquimales (fibroblastos meníngeos, fibroblastos perivasculares y pericitos) intentan restablecer la BHE formando una nueva frontera recubierta por una lámina basal. Para ello, los astrocitos pasan a estado reactivo y acuden junto con las células mesenquimales a la zona lesionada, segregando al tejido lesionado proteínas de ECM. Todo ello forma la cicatriz glial que, a pesar de tener un efecto beneficioso al evitar la extravasación de sustancias tóxicas y células del torrente sanguíneo al parénquima, reduciendo la respuesta inflamatoria y favoreciendo la homeostasis tisular, es una de las principales causas de la inhibición de la regeneración axonal.

Un gran número de citoquinas y factores de crecimiento son secretados al tejido nervioso cuando ocurre una lesión, entre ellos el TGF β . Dicho factor de crecimiento aumenta la transcripción, traducción y secreción de proteoglicanos, unas macromoléculas de ECM que, junto con otras proteínas profibróticas, forman parte de la cicatriz glial formada tras la lesión. Todas ellas están implicadas en la inhibición de la regeneración tras el daño. La síntesis y secreción de proteoglicanos y proteínas de ECM se lleva a cabo en el RER, y cuando ocurre una situación de estrés, como es una lesión, el factor de traducción de eIF2 α se fosforila y reduce la síntesis de estas proteínas. Cuando la situación de estrés finaliza, eIF2 α es desfosforilado, restaurando así la traducción de proteínas del RER a su estado normal. Por ello, la fosforilación y desfosforilación de eIF2 α asegura un control de la síntesis y secreción de proteínas acorde con los cambios que ocurren en el microambiente tras la lesión.

El Salubrinal es una pequeña molécula que modula el estrés del RE manteniendo eIF2 α fosforilado, por lo que modula la síntesis de proteínas, entre ellas las de ECM. Varios estudios han probado el efecto neuroprotector del Salubrinal, y aquí proponemos su posible efecto modulador de la cicatriz glial.

El objetivo general del proyecto es estudiar el efecto del Salubrinal como modulador de la reactividad glial y de la formación de la cicatriz. Para abordar dicho estudio, se llevaron a cabo dos aproximaciones. En la primera de ellas, analizamos el efecto del Salubrinal en cultivos celulares de astrocitos y fibroblastos, principales componentes de la cicatriz glial. A continuación, evaluamos el efecto del Salubrinal en un modelo *in vivo*, donde utilizamos ratones adultos a los que se les practicó una lesión lacerante en la corteza cerebral.

El efecto del Salubrinal sobre la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas fue evaluada en cultivos de astrocitos procedentes de cortezas cerebrales murinas, tratados con TGF β o EGF y con Sal003. El Salubrinal redujo la transcripción y traducción de proteoglicanos y proteínas profibróticas inducidas por TGF β o EGF en cultivos de astrocitos.

A continuación, estudiamos el efecto de la droga en el modelo *in vitro* de cicatriz glial descrito anteriormente por Kimura-Kuroda y colaboradores, en el que se cocultivan fibroblastos y astrocitos tratados con TGF β y, posteriormente, se siembran neuronas sobre ellos. Evaluamos el efecto del Salubrinal en el crecimiento neurítico mediante un análisis estereológico. El Salubrinal rescató la inhibición del crecimiento neurítico inducida por TGF β , por lo que podría ser una terapia beneficiosa para la regeneración axonal.

Una vez demostrados sus efectos *in vitro*, evaluamos el efecto del Salubrinal en un modelo de lesión lacerante en la corteza cerebral murina. Para ello, llevamos a cabo diferentes estrategias en las que los ratones lesionados fueron tratados con Sal003 durante los 3 primeros días tras la lesión (tratamiento agudo), o a partir de los 8 dpl, cada 48 horas (tratamiento crónico), y se sacrificaron a los 3 (fase aguda de la lesión) o a los 21 dpl (fase de consolidación de la lesión). El tratamiento agudo con Salubrinal aumentó la supervivencia neuronal a corto plazo. Dichas neuronas próximas a la zona lesionada expresan el factor de crecimiento PDGF-B, que causa un incremento en la expresión de fibronectina, lo que contribuye a la formación de la cicatriz glial. Esta cicatriz impide la extravasación masiva de moléculas y células procedentes de la sangre al cerebro, lo que disminuye la inflamación en el tejido nervioso. Todo ello favorece a largo plazo la supervivencia neuronal en la zona adyacente a la lesión.

El efecto del Salubrinal varía según su momento de administración, por lo que dependiendo del marco temporal de administración tras haberse producido la lesión, el Salubrinal podría ser una terapia beneficiosa en lesiones mecánicas del SNC, induciendo neuroprotección, modulando la formación de la cicatriz glial y posibilitando la recuperación funcional tras el daño.

Abstract

Severe CNS injuries are one of the main causes of disability in developed countries. In the injured tissue two chronologically sequential processes occur. The first is the primary neuronal death and nerve fiber interruption in the injured area. The second is the secondary neuronal death caused by cell degeneration due to the set of biochemical processes happening in the injured area and the growth inhibitory microenvironment generated. Microglial cells react and migrate to the injured area, changing its morphology and turning into a reactive state. They express proinflammatory molecules, which aims to remove damaged cells and toxic substances. This triggers a rapid inflammatory response, which is initially required, but detrimental if it is extended over time because it contributes to secondary neuronal damage.

Astrocytes and mesenchymal cells (meningeal fibroblasts, perivascular fibroblasts and pericytes) try to reestablish the BBB forming a border covered by a basal lamina, which limits the entrance of substances and cells from the blood to the brain. Astrocytes contribute by turning reactive and, along with mesenchymal cells, go into the injured area, secreting ECM proteins to the damaged tissue. All of this generates the glial scar which, in spite of having a beneficial effect by preventing leakage and reducing the inflammatory response, is a physical and functional barrier that prevents axonal regeneration.

After injury, cytokines and growth factors are secreted to the damage tissue, including TGF β . This growth factor increases transcription, translation and secretion of proteoglycans that along with other profibrotic proteins form the glial scar. All of them are involved in the inhibition of regeneration after damage. The synthesis and secretion of ECM proteins and proteoglycans occurs in the RER. After an injury, the transcription factor eIF2 α is phosphorylated, which commands a reduction in the synthesis of proteins at the RER. When the stressful situation ends, eIF2 α is dephosphorylated and the protein translation is restored. The modulation of phosphorylation and dephosphorylation of eIF2 α ensures the control of the synthesis and secretion of proteins according to the changes occurring after injury.

Salubrinal is a small molecule that inhibits eIF2 α dephosphorylation, reducing the protein synthesis, including those at the ECM. Several studies have shown its neuroprotective effect, and in this study we suggest a possible effect modulating glial scar formation.

The objective of this project was to study the effect of Salubrinal on the modulation of glial reactivity and the formation of the glial scar. We approached this purpose in two ways: first we analyzed the effect of Salubrinal on the most characteristic component of the

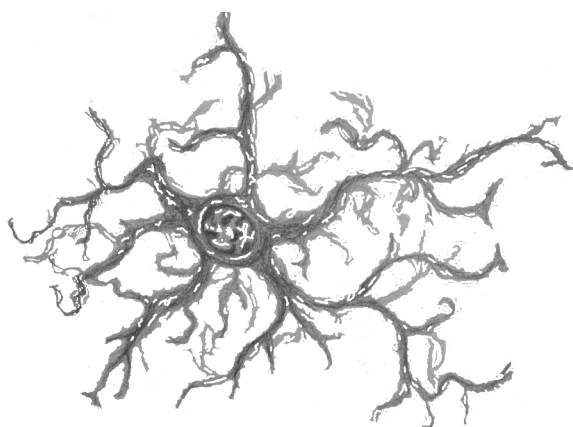
glial scar, astrocytes, in culture, as an *in vitro* model of the glial scar. Next, we evaluated the effect of Salubrinal on the scar formed after a stab wound injury in the mice cortex.

The use of astrocyte cultures from mouse cerebral cortex, permitted us to evaluate the effect of Salubrinal on the expression and secretion of proteoglycans and profibrotic proteins by these cells, treated with TGF β or EGF and Sal003. Salubrinal reduced the transcription and translation of proteoglycans and profibrotic proteins induced by TGF β or EGF in cultured astrocytes.

Then we studied the effect of Salubrinal in the glial scar *in vitro* model described by Kimura-Kuroda et al. In that model fibroblasts and astrocytes are cocultured, treated with TGF β , and, then, neurons are plated on them. We evaluated the effect of Salubrinal on neurite outgrowth by stereological analysis. Salubrinal rescued neurite outgrowth inhibition induced by TGF β . Therefore, it could be a beneficial therapy for axonal regeneration.

The effect of Salubrinal on a stab wound injury in the mouse cortex was evaluated using different approaches: mice were treated with Sal003 during the first 3 days after injury (acute treatment), or from 8 days after injury, every 48 hours (chronic treatment), and sacrificed after 3 (acute phase of injury) or 21 dpl (consolidation phase of injury). Acute treatment of Salubrinal increased neuronal survival in short-term. These neurons from the injured area express PDGF-B, which causes an increase in the expression of fibronectin, which contributes to the formation of the glial scar. The scar prevents extravasation of molecules and cells from the blood to the brain, reducing inflammation in the nervous tissue. This favors long-term neuronal survival near the lesion area.

The effect of Salubrinal depends on the time of administration, so Salubrinal could be a beneficial therapy in mechanical CNS injuries by inducing neuroprotection, modulating the formation of glial scar and enabling functional recovery after damage.



Introducción

1. Lesiones en el Sistema Nervioso Central

Las lesiones severas del sistema nervioso central (SNC), originadas por patologías cerebrovasculares o contusiones mecánicas (como las lesiones medulares), representan una de las principales causas de incapacidad en países desarrollados, causando no sólo daños en la integridad física del individuo, sino también un gran impacto socioeconómico para la persona, la familia y el Estado. Las neuronas lesionadas no se regeneran, y el resultado son importantes déficits funcionales permanentes con graves consecuencias humanas y económicas. Actualmente, según la asociación española ASPAYM (Asociación de Lesionados Medulares y Grandes Discapacitados Físicos), la incidencia europea de lesionados medulares va en aumento, alcanzando en España cifras de 12 a 20 casos nuevos por millón de habitantes cada año, y puede afectar a unas 20 - 40 personas por millón en todo el mundo (Tator and Fehlings, 1991). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2020 la lesión medular ocupará una de las cinco principales causas de discapacidad a nivel mundial.

Según la afectación de la integridad física de la barrera hematoencefálica (BHE), las lesiones mecánicas del SNC se clasifican en lesiones anisomórficas (las que afectan directamente la morfología de la barrera y los vasos sanguíneos) y lesiones isomórficas (en las que no existen efectos obvios en los parámetros anteriores) (Fernaund-Espinosa et al., 1993). En el segundo caso, las células gliales, como los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos, sufren una serie de cambios morfológicos y moleculares, transformándose en células reactivas, y produciendo entonces una serie de sustancias (mediadores inflamatorios) que desencadenan el proceso inflamatorio. En las lesiones anisomórficas, además de esa reactividad glial, la BHE sufre un daño morfológico y pierde su integridad física, permitiendo que los vasos sanguíneos lesionados liberen su contenido al parénquima nervioso, y las células de la sangre (como los monocitos, los neutrófilos y los linfocitos) y los fibroblastos migran hacia la zona lesionada, produciendo una reacción inflamatoria alrededor de la lesión.

2. Formación de la cicatriz glial después de una lesión en el SNC

Una vez producida la lesión, van a ocurrir dos procesos cronológicamente secuenciales. El primero de ellos es la muerte neuronal primaria y la axotomía de las neuronas presentes en la zona de la lesión, causados directamente por el trauma mecánico (Profyris et al., 2004). El segundo es la muerte neuronal secundaria producida por la degeneración de las neuronas cercanas a la lesión debido al conjunto de los procesos bioquímicos que están sucediendo en la zona de lesión, y por la creación de un microambiente inhibitorio para la regeneración (Shechter and Schwartz, 2013). Aparte de todo eso, y para limitar el

paso de sustancias y células procedentes de los vasos sanguíneos, las células gliales (en su mayoría astrocitos) y los fibroblastos intentan restablecer la BHE formando una nueva frontera recubierta por una lámina basal. Esta estructura se denomina cicatriz glial (Berry et al., 1983; Fawcett and Asher, 1999). Dicha cicatriz, a pesar de que evita el paso de sustancias tóxicas y células procedentes del torrente sanguíneo reduciendo la respuesta inflamatoria y favoreciendo la homeostasis tisular, teniendo, por tanto, un efecto beneficioso, es una de las principales causas de la inhibición de la regeneración axonal (Bovolenta et al., 1992; Raposo and Schwartz, 2014). Aunque contiene sustancias favorecedoras para la regeneración (como la laminina y la fibronectina), su principal componente son los proteoglicanos producidos por las células gliales, que se han convertido en reactivas, y son inhibidores de dicha regeneración (Asher et al., 2001; Fawcett, 2009).

La formación de la cicatriz glial después de una lesión se lleva a cabo en tres fases superpuestas, pero diferenciadas (Figura 1): la fase aguda (o hemorrágica) que ocurre desde que se produce la lesión hasta los 3 días postlesión (dpl), la fase subaguda, que abarca desde los 4 a los 8 dpl, y la fase de consolidación, que va desde los 9 hasta los 21 dpl (Logan and Berry, 2002), en los que se supone que se ha cerrado por completo la herida y se ha formado totalmente la cicatriz glial.

Fase aguda: durante esta fase las células residentes del SNC (como los astrocitos y, en especial, la microglía) se convierten en células reactivas, liberando citoquinas y quimioquinas. Éstas favorecen la migración de las células reactivas hacia la zona de lesión, y la invasión de leucocitos (como neutrófilos, monocitos y linfocitos sanguíneos) al parénquima neural, iniciándose así la cascada inflamatoria (Dore-Duffy et al., 2000; Streit, 2000). Por otro lado, las plaquetas cierran inicialmente la herida mediante la formación de un coágulo, rodeando el tejido necrótico. Además, la microglía y los macrófagos sanguíneos detectan cambios en el microambiente y fagocitan las neuronas no funcionales y los restos de los axones dañados. Al final de la fase aguda, la cavidad de la lesión reduce su tamaño.

Fase subaguda: la estructura de la cicatriz se empieza a definir durante esta fase, debido a la deposición de una capa de lámina basal rodeada de astrocitos y de tejido conectivo procedente de la pia madre (Reier and Houle, 1988). Los astrocitos reactivos alcanzan un pico en esta fase de la formación de la cicatriz, expresando altos niveles de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Tanto estos astrocitos, como los fibroblastos procedentes de las meninges forman una lámina basal, rica en colágeno tipo IV (ColIV) y laminina (Dubois et al., 1988; Kalman and Szabo, 2000). Además los astrocitos reactivos forman una matriz extracelular (ECM), compuesta por proteoglicanos, todos ellos con alta capacidad inhibitoria de la regeneración axonal (Asher et al., 2001). Los astrocitos reactivos tienen un papel protector en el SNC dañado, contribuyendo

a la formación de la cicatriz glial, reparando la BHE y produciendo citoquinas y moléculas esenciales para el metabolismo de los aminoácidos (Eddleston and Mucke, 1993).

Fase de consolidación: durante la fase de consolidación la parte más cercana al núcleo de la lesión se contrae y se rodea de ECM rica en colágeno y fibronectina (producida principalmente por los fibroblastos), sin desaparecer del todo la microglía (Maxwell et al., 1984). Disminuye la cantidad de astrocitos reactivos que se encontraban a cierta distancia de la lesión, concentrándose la mayoría adyacentes a la lámina basal, conectándose entre ellos a través de uniones gap y uniones estrechas (Mathewson and Berry, 1985). Durante esta fase mueren numerosas neuronas y se forman cavidades quísticas, cuya pared está formada por los procesos de los astrocitos reactivos.

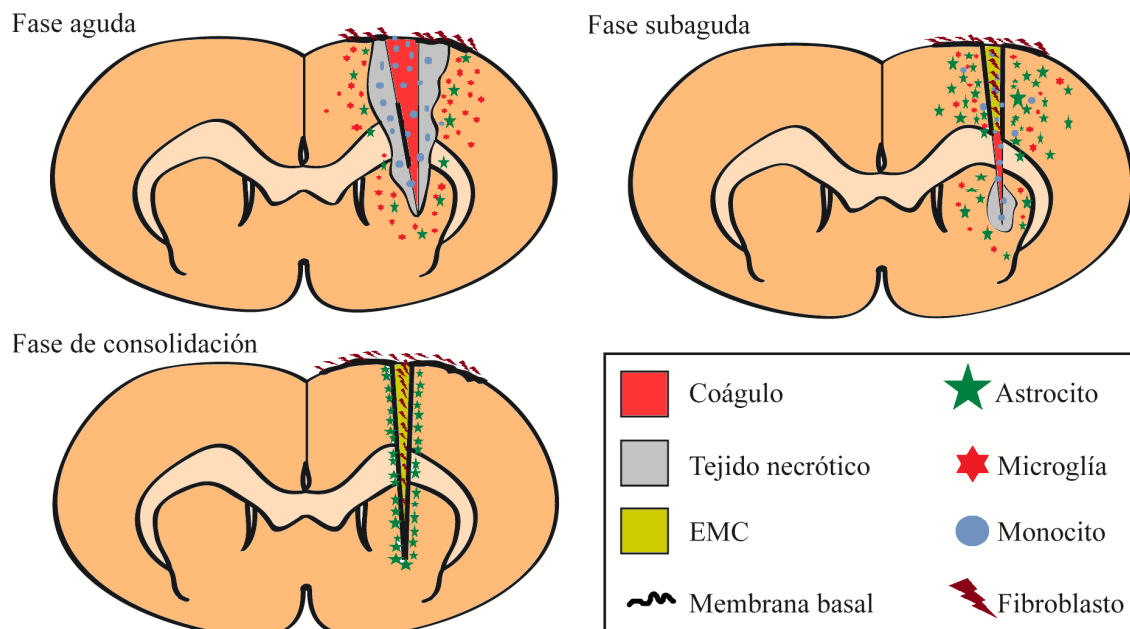


Figura 1: Dibujo esquemático de las fases de formación de una cicatriz glial después de una lesión en el SNC. Durante la formación de la cicatriz pueden distinguirse tres fases: la fase aguda (o hemorrágica), desde que ocurre la lesión hasta los 3 dpl y en la que predomina un estado inflamatorio, la fase subaguda, desde los 4 a los 8 dpl en la que los astrocitos alcanzan su pico de astrogliosis y, junto con los fibroblastos, empiezan a definir la cicatriz, y la fase de consolidación, desde los 9 hasta los 21 dpl, en la que la estructura cicatricial es firme y reduce el paso de moléculas procedentes del torrente sanguíneo.

En el contexto de la neurodegeneración, la formación de la cicatriz glial se ha visto que tiene tanto efectos beneficiosos como perjudiciales. En particular, muchas moléculas inhibitoras del desarrollo neurológico son secretadas por las células que componen la cicatriz, impidiendo la recuperación funcional del sistema nervioso después de una lesión. Por otro

lado, la ausencia de la cicatriz glial ha sido asociada con deficiencias en la reparación de la BHE, tan necesaria para impedir el paso de moléculas extrañas al tejido nervioso. Es por ello, que es preciso un amplio estudio de la formación de esa cicatriz a lo largo del tiempo tras el cual se ha producido la lesión para poder modularla.

3. Componentes celulares de la cicatriz glial

Durante las diferentes fases de formación de la cicatriz, predominan una serie de células que sufren cambios morfológicos y moleculares, causantes de la muerte neuronal y de la ausencia de regeneración axonal tras la lesión. Los tres tipos celulares predominantes son: microglía, fibroblastos y astrocitos. Estos, y el resto de células presentes en el SNC después de una lesión o una patología, forman parte de un complicado proceso en el que unas influyen sobre otras y tienen efectos, tanto perjudiciales como beneficiosos, en la recuperación tras el daño ocasionado (Gao et al., 2013).

3.1. Microglía

Este tipo celular juega un papel muy importante en el tejido nervioso, ya que son capaces de fagocitar los componentes de desecho y estructuras dañadas (Kreutzberg, 1996). Además, forman parte del sistema inmune del SNC, actuando como células presentadoras de antígeno y secretando citoquinas y factores de crecimiento. Son células de origen mesenquimal, que a lo largo del desarrollo se especializan en población residente del sistema nervioso (Ajami et al., 2007). Su capacidad inmunocompetente se acredita cuando el tejido ha sido dañado mediante una lesión o trauma, o en ciertas enfermedades neurológicas, como la esclerosis múltiple (Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999). Cuando esto ocurre, las células de microglía reaccionan y se acercan a la zona lesionada, modificando su morfología (normalmente ramificada y adquiriendo un aspecto ameboide, pasando a ser microglía reactiva (Figura 2). Expresan moléculas proinflamatorias (como la interleuquina 1 (IL-1), o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)), que tienen por objetivo eliminar células dañadas y agentes patógenos perjudiciales, pero que también pueden exacerbar la inflamación (Sato et al., 2012). Todo ello desencadena una rápida cascada inflamatoria que, en el caso de las lesiones mecánicas en el SNC, ocurre desde los pocos minutos tras producido el daño y predomina, aproximadamente, durante los 3 primeros días. La prolongación en el tiempo de esta inflamación puede llegar a ser perjudicial para el tejido nervioso, ya que daña a las neuronas supervivientes presentes en la zona de lesión, contribuyendo al daño neuronal secundario y, por tanto, a la cronificación de la patología (Kim and de Vellis, 2005). Además, durante la inflamación, la alta concentración de microglía y de las moléculas que segrega al

medio, contribuyen a crear de un microambiente inhibitorio para la proliferación de los progenitores de oligodendrocitos (el tercer tipo celular glial), tan importantes para las neuronas al formar las vainas de mielina que rodean los axones neuronales (Wu et al., 2010). En los últimos años se han diferenciado dos tipos de microglía según la función que realizan en el tejido nervioso: uno proinflamatorio (el clásico o M1), y otro antiinflamatorio y con capacidad regenerativa tras la lesión (el alternativo o M2) (Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004). Su balance y presencia temporal serán importantes para el control de la inflamación tras una lesión en el SNC (Hausmann, 2003; Kigerl et al., 2009).

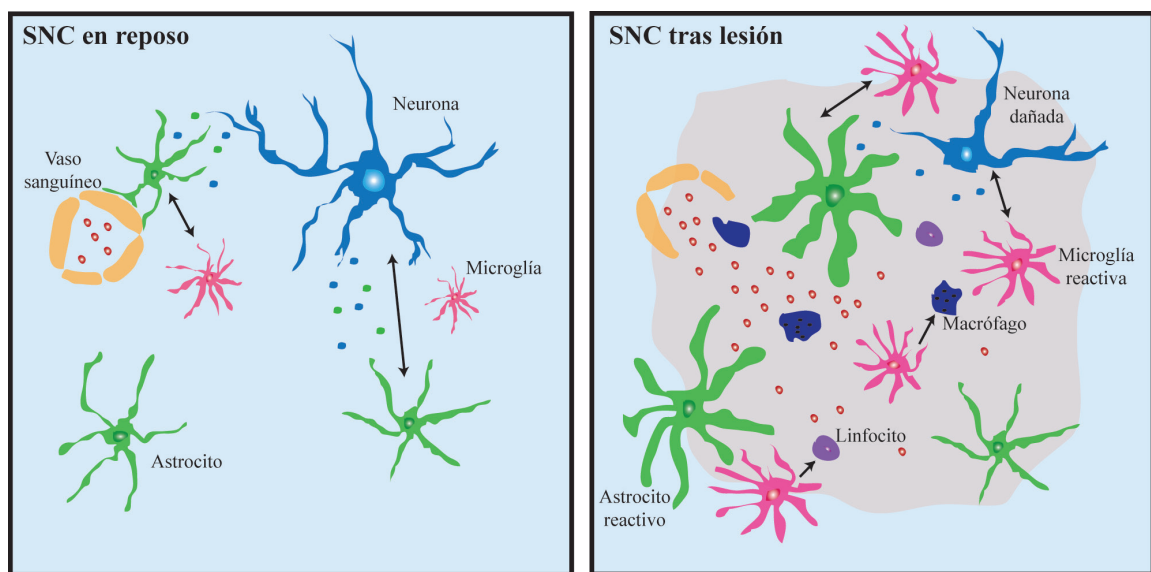


Figura 2: Activación de las células gliales. En su estado en reposo, la microglía recibe señales de las neuronas y mantienen su apariencia ramificada, mientras que los astrocitos establecen contactos con los vasos sanguíneos, formando la BHE. Al producirse un daño en el SNC, ambas células pasan a estado reactivo: la microglía secreta moléculas y recluta linfocitos y macrófagos que participan en la respuesta inflamatoria, y los astrocitos colaboran también en esa respuesta inflamatoria y forman una cicatriz glial para cerrar la herida.

3.2. Fibroblastos

Los fibroblastos son células procedentes del tejido conjuntivo que sintetizan colágeno y glicoproteínas, como la fibronectina, que contribuyen a la formación de la ECM. Forman parte de las meninges que rodean el SNC, y al producirse una lesión lacerante tanto las meninges como el tejido se rompen, permitiendo el paso de los fibroblastos a la zona lesionada. Junto con los astrocitos forman la cicatriz, creando una barrera que protege el tejido nervioso del exterior. En estudios realizados *in vitro* en los que se cocultivan astrocitos y fibroblastos y a los que se añaden neuronas encima, se ha comprobado que las neuronas evitan crecer hacia los fibroblastos, indicando por tanto que estos son menos permisivos para

favorecer el crecimiento axonal (Shearer and Fawcett, 2001). Asimismo, en un modelo traumático de lesión cerebral en ratones, se ha demostrado que suprimiendo la formación de la cicatriz fibrótica, se promueve la regeneración axonal (Yoshioka et al., 2010). Sin embargo, las inyecciones de fibronectina en animales con lesión medular crónica reducen significativamente la respuesta inflamatoria y, por lo tanto, disminuyen la alodinia (Lin et al., 2012). Por ello será necesario el control de la producción de colágeno y proteínas de ECM a lo largo del tiempo tras la lesión para evitar el paso de moléculas extrañas al tejido y provocar una respuesta inflamatoria aguda, pero también para que pueda haber regeneración axonal. En los últimos años han sido descritos varios tipos de fibroblastos perivasculares, que migrarán a la zona de la lesión formando parte de la cicatriz glial tras una lesión en la médula espinal, como los pericitos (Goritz et al., 2011), o los fibroblastos perivasculares (Soderblom et al., 2013). Probablemente, tanto los fibroblastos de las meninges, como los fibroblastos perivasculares y los pericitos formen un entramado de células profibróticas mesenquimales, que contribuyen a la formación y mantenimiento de la cicatriz glial.

3.3. Astrocitos

Los astrocitos son las principales y más numerosas células gliales del SNC. Son de origen neuroectodérmico y derivan de la glia radial (Mission et al., 1991). Su morfología, como indica su nombre, es estrellada por la gran cantidad de prolongaciones que irradian del soma hacia células vecinas. Algunas de estas prolongaciones entran en contacto con vasos sanguíneos, formando podocitos, o envuelven sinapsis nerviosas. Su núcleo es más claro que el de otras células de la glía, y el citoplasma contiene numerosos gránulos de glucógeno y filamentos intermedios, compuestos de GFAP, característicos de este tipo celular. Desde principios del siglo XX los astrocitos han sido clasificados en dos subtipos diferentes según sus características morfológicas y su localización anatómica: protoplásmicos y fibrosos, una clasificación que todavía sigue vigente. Los primeros se encuentran situados en la materia gris y presentan forma estrellada con muchos procesos estrechos y cortos. Los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca y sus procesos son más alargados (Ramon y Cajal, 1909-1911). Ambos tipos astrocitarios están en contacto con los vasos sanguíneos.

Tras los estudios que realizó a finales del siglo XIX Santiago Ramón y Cajal, se reconoció a este tipo celular una función activa en la fisiología neuronal, desechando la idea anterior de ser un mero relleno en el tejido nervioso (al estar conectados físicamente entre ellos, generan el soporte de todo el SNC). Actualmente se sabe que desempeñan una importante función en varios aspectos del desarrollo, el metabolismo y las patologías del sistema nervioso. Son muy importantes en el soporte trófico y metabólico de la neurona, ya que controlan el paso de nutrientes y sustancias de desecho a través de la BHE, al estar en

contacto directo con ésta. Así mismo controlan el equilibrio iónico extracelular y mantienen el pH del sistema nervioso, conservando así su homeostasis (Allen and Barres, 2009). Así, son esenciales en la supervivencia, diferenciación y guía neuronal. En los últimos años se ha descubierto que existe conexión entre las neuronas y astrocitos, participando en la transmisión de la señal nerviosa a través de la llamada sinapsis tripartita (Araque et al., 2001).

Cuando se produce una patología o una lesión en el SNC, los astrocitos pasan a estado reactivo, que normalmente irá precedido por una activación microglial (Figura 2). Durante la activación astrocitaria se induce la expresión de diversos genes, que hacen que la célula pase a estado reactivo, y que dan lugar a diferentes tipos de astrocitos reactivos según la patología (Zamanian et al., 2012). En todos ellos, esa activación astroglial lleva consigo un aumento de tamaño del citoplasma celular, debido a la mayor producción de filamentos intermedios como GFAP y vimentina, que se convierten en marcadores característicos de los astrocitos reactivos (Ridet et al., 1997). La activación no es un fenómeno de todo o nada, sino que ocurre gradualmente y está controlada por una serie de cambios progresivos en la hipertrofia celular y en la expresión génica (Sofroniew and Vinters, 2010). Además de un cambio morfológico, después de una lesión, el astrocito reactivo cambia su fisiología y genera un amplio repertorio de moléculas como proteínas de ECM (proteoglicanos, tenascinas), factores de crecimiento y citoquinas (como el factor de crecimiento tumoral tipo beta (TGF β) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6)), proteasas, proteínas de unión a calcio (S100 β), y radicales libres (Morganti-Kossmann et al., 1992; Malhotra and Shnitka, 1994; Dong and Benveniste, 2001). Todas ellas aumentan la gliosis reactiva, provocando mayor daño neuronal e impidiendo la regeneración axonal (Silver and Miller, 2004). A parte de esas células preexistentes que cambian de morfología, tras una lesión medular surgen otro tipo de astrocitos procedente de células endimales diferenciadas, que también están presentes en la zona lesionada, pero en vez de recubrir la herida, forman parte del núcleo de la cicatriz (Barnabe-Heider et al., 2010). Es por ello que, además de ese papel perjudicial para la regeneración al migrar hacia la zona lesionada y rodear el centro de la lesión aislando la entrada de células inflamatorias, los astrocitos son unas células fundamentales para que se pueda recuperar la funcionalidad nerviosa (Renault-Mihara et al., 2008).

4. Componentes moleculares de la cicatriz glial

El fallo de la regeneración axonal tras el daño en el SNC se ha atribuido a dos factores limitantes: la reducida capacidad de crecimiento axonal y dendrítico de las neuronas maduras, y la presencia de moléculas inhibitoras producidas por los astrocitos y los oligodendro-

drocitos (Liu et al., 2006). Tras una lesión mecánica en el SNC, las células formadoras de la cicatriz segregan en la zona lesionada una serie de sustancias inhibitoras de la regeneración axonal, impidiendo, por tanto, la recuperación funcional tras el daño. Esa respuesta celular al daño ocasionado consiste en un incremento de la síntesis de componentes de ECM, como los condroitín sulfato proteoglicanos (CSPGs) y otras proteínas de ECM, como las tenascinas (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008).

La familia de los CSPGs representa una amplia variedad de macromoléculas cuyos tamaños pueden oscilar entre los 80 y los 3500 kDa (Silbert and Sugumaran, 2002). En todas ellas existe una estructura común compuesta por un núcleo proteico central al que se unen de forma covalente una serie de cadenas de carbohidratos, conocidas como glicosaminoglicanos (GAG), que en el caso de los CSPGs son condroitín sulfato (Prydz and Dalen, 2000; Hartmann and Maurer, 2001). Según el número, la longitud y la sulfatación de las cadenas, podremos distinguir entre varios tipos de CSPGs, como agregán, brevicán, fosfacán, neurocán, NG2, versicán... Todos ellos están implicados en la inhibición de la regeneración tras el daño en el SNC ya que aumentan sus niveles, inhiben el crecimiento neurítico en modelos *in vitro*, la ruptura de sus cadenas permite el crecimiento neurítico en modelos *in vivo*, y son capaces de formar barreras para los axones durante el desarrollo (Morgenstern et al., 2002; Klausmeyer et al., 2011; Beller and Snow, 2014). Además, están implicados en la ausencia de plasticidad y en la neurodegeneración que se manifiestan en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, la esclerosis múltiple o el Parkinson (Kwok et al., 2008).

En la mayoría de los casos, la mayor parte de la actividad inhibitora del crecimiento axonal por parte de los proteoglicanos reside en el componente glicídico. A pesar de ello, hay ciertos proteoglicanos, como el versicán, donde la parte proteica tiene un papel fundamental en esta actividad (Galtrey and Fawcett, 2007). Tanto la síntesis del componente proteico como el comienzo de la glicosilación de los proteoglicanos ocurren en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico (RE) o retículo endoplásmico rugoso (RER) (Vertel et al., 1989). Las enzimas xilosiltransferasa tipo I y II (XT-I y XT-II) inician el proceso de glicosilación, uniendo el monosacárido D-xilosa al aminoácido serina de la secuencia proteica (Kearns et al., 1993). Sucesivas glicosilaciones ocurren a lo largo del transporte del RER al aparato de Golgi y de su transporte en vesículas a la membrana celular (Vertel et al., 1993). Más tarde, el factor de polimerización de condroitina (CPF) forma puentes entre las diferentes cadenas de polisacáridos incrementando su complejidad (Kitagawa et al., 2003). Finalmente, las sulfotransferasas añaden grupos sulfato, incorporando cargas negativas a la estructura. Tanto la adición de grupos sulfato, como el aumento de la polimerización de la estructura glicídica aumentan la capacidad inhibitora del proteoglicano (Laabs et al., 2007).

Los CSPGs, junto con el ácido hialurónico, son los principales componentes de las redes perineuronales (acumulaciones de matriz extracelular que rodean ciertas neuronas del cerebro y la médula espinal) y juegan un papel importante en la regulación de la excitabilidad y la plasticidad neuronal (Kwok et al., 2010). Existen tres posibles mecanismos por los que los proteoglicanos tienen efectos inhibitorios sobre la regeneración: i) interacción directa a través de los GAG de los proteoglicanos con las redes perineuronales, ii) los proteoglicanos hacen a las redes perineuronales sustratos no permisivos para las integrinas y otras moléculas de crecimiento axonal, iii) interacción indirecta de los GAG de los proteoglicanos con las redes perineuronales y presentación de proteínas inhibitorias (Kwok et al., 2011). Por ello y, aunque los proteoglicanos juegan un papel primordial en el control de la inflamación tras una lesión en el SNC, el control del balance entre la síntesis y su degradación podría contribuir, en parte, a la regeneración y recuperación tras el daño (Sherman and Back, 2008).

La producción de proteoglicanos y proteínas de ECM que forman la cicatriz glial está promovida por citoquinas y factores de crecimiento. Entre esos factores de crecimiento se encuentra el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y, principalmente, el TGF β .

5. Papel del TGF β durante la formación de la cicatriz glial

Un gran número de citoquinas y factores de crecimiento son secretados al tejido nervioso cuando ocurre una lesión. Entre esos factores se encuentra la superfamilia del TGF β , que en mamíferos se han encontrado tres isoformas diferentes: TGF β 1, - β 2 y - β 3 (Cui and Akhurst, 1996). Estas proteínas tienen una estructura homodimérica, y son producidas por una gran cantidad de células, siendo las principales en el tejido nervioso adulto los astrocitos, las neuronas y las células endodiales (Unsicker et al., 1991). La familia del TGF β regula muchos procesos fisiológicos, como desarrollo, angiogénesis, proliferación, homeostasis tisular, inflamación y regeneración tras daño (Massague, 1990). Por otro lado, cuando se produce una lesión en el tejido nervioso, entre los factores de crecimiento que aumentan la transcripción, traducción y secreción de proteoglicanos que forman la cicatriz está la familia del TGF β (Gris et al., 2007). La producción de la cicatriz glial está específicamente atribuida a TGF β 2, que está expresado por muchos tipos celulares durante la formación de la cicatriz, pero que predomina en los astrocitos reactivos después de haberse producido la lesión (Lagord et al., 2002).

En general, la ruta de señalización del TGF β se inicia con la oligomerización inducida por ligando de los receptores serina/treonina quinasa 1 y 2 del TGF β (TGFBR1

y TGFBR2) (Figura 3) (Wrana et al., 1994). Cuando el ligando se une al TGFBR2, éste activa al TGFBR1, lo que propicia la fosforilación en su extremo carboxilo terminal de las moléculas Smad2 y Smad3. Estas moléculas permanecen ancladas al receptor mediante el péptido SARA (anclaje para la activación del receptor) y, al fosforilarse, esa unión se altera y Smad2/3 se suelta del receptor. Una vez libres, viajan por el citoplasma celular y se unen a la molécula Smad4, formando un complejo, que atraviesa la membrana nuclear y entra en el núcleo celular (Shi and Massague, 2003). Una vez en el núcleo, se unen de forma específica a la secuencia CAGA de promotores, lo que regula de forma específica la transcripción de varios genes y por ello tiene diversos efectos biológicos (Dennler et al., 1998). A esta ruta se la denomina ruta canónica del TGF β .

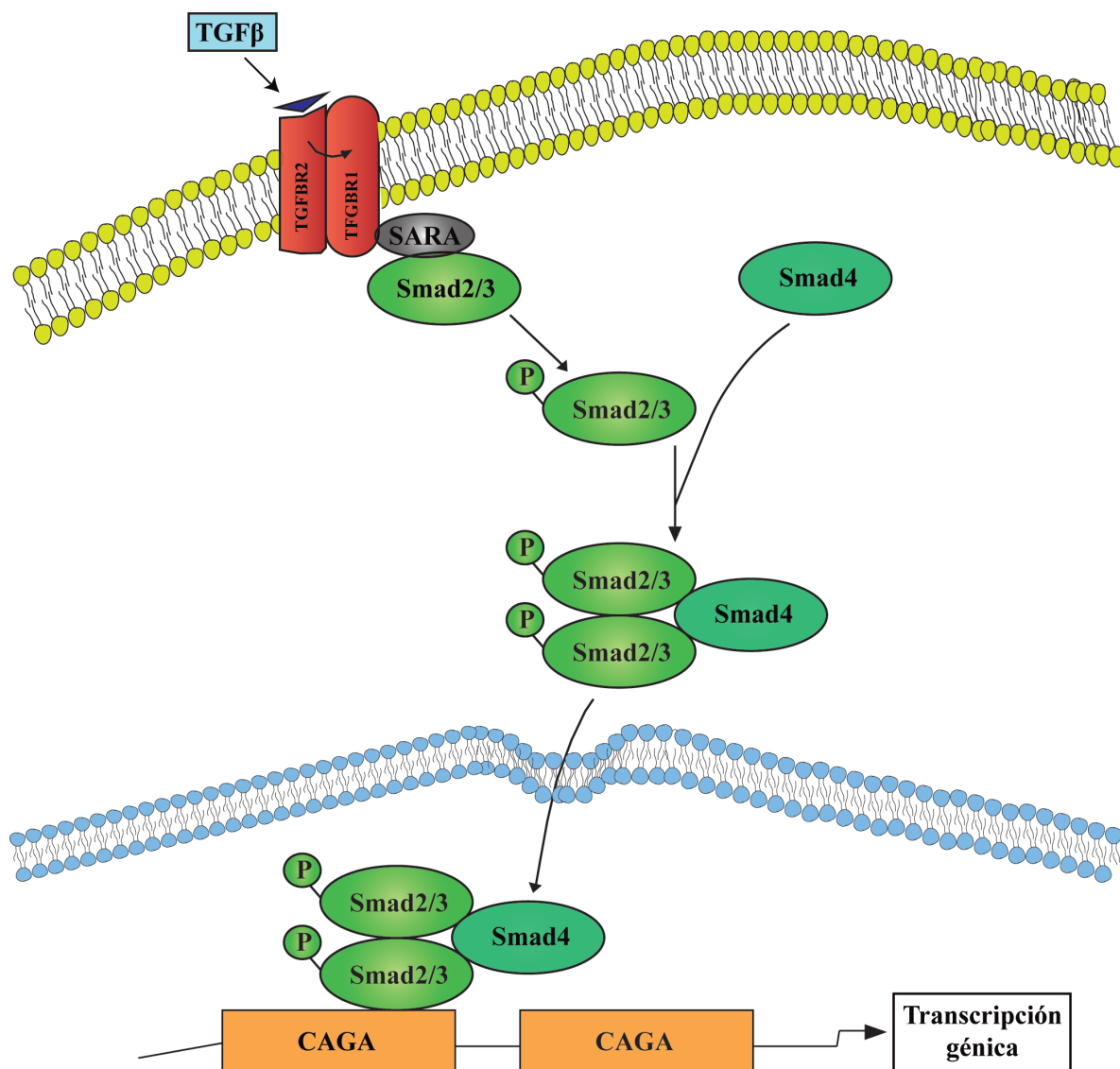


Figura 3: Ruta clásica de señalización de TGF β . La unión del ligando a los receptores de TGF β hace que estos oligomericen. El ligando se une a TGFBR2, que activa a TGFBR1, y fosforila a Smad2/3, que se sueltan de los receptores. Una vez en el citoplasma, se unen a Smad4 y el complejo se transloca al núcleo, donde se unen a la secuencia CAGA de promotores y activan la transcripción génica.

La ruta del TGF β activa otras rutas, llamadas no canónicas, independientes de Smad2/3 que también cooperan en la inducción transcripcional.

Entre estos genes, se encuentran los encargados de la transcripción y posterior traducción y secreción de proteoglicanos. En varios estudios se ha comprobado que la ruta del TGF β está implicada directamente en la producción de estas moléculas, por ejemplo en la producción de brevicán en cultivos de astrocitos (Hamel et al., 2005), o después de una lesión cerebral los astrocitos reactivos potencian los niveles de TGF β , aumentando la producción de proteoglicanos por parte de la microglía (Yin et al., 2009). Este incremento en los niveles de TGF β activa la ruta de Smad2/3, que provoca la secreción de proteoglicanos y estos contribuyen a la formación de la cicatriz glial (Schachtrup et al., 2010). Además, la inhibición del TGF β a través de la ruta de Smad2/3 reduce la cicatriz y favorece la regeneración axonal (Yoshioka et al., 2011). Por otro lado, la ruta del TGF β activa el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF), expresado por los astrocitos, y que contribuye en la formación la cicatriz glial al aumentar los niveles de proteínas de ECM después de una lesión cerebral (Hertel et al., 2000; Schwab et al., 2000; Schwab et al., 2001).

A consecuencia de todo esto, tras una lesión en el SNC, el papel del TGF β es el de regular la formación de la cicatriz glial (Doyle et al., 2010) y, debido a ello, es una ruta primordial que sería bueno controlar para poder conseguir regeneración y que el tejido nervioso recupere su funcionalidad.

6. Implicación por parte de eIF2alfa en la regulación de la cicatriz glial

El RE es un orgánulo muy complejo y compartimentalizado en el que ocurren muchas funciones diferentes importantes para el desarrollo y funcionamiento normal de la célula, por lo que también es esencial en el desarrollo de diferentes patologías (Lynes and Simmen, 2011; Reid et al., 2014). En general, la síntesis y secreción de factores de crecimiento, citoquinas y sus receptores transmembrana tiene lugar en los ribosomas asociados al RE o RER. Lo mismo ocurre en el caso de los proteoglicanos y las proteínas de matriz extracelular, cuyo componente proteico se sintetiza en los ribosomas asociados al RER, y el comienzo de la glicosilación ocurre también en este orgánulo gracias a la XT-I y XT-II. Por ello, será importante controlar y regular la síntesis de proteínas para que exista un buen funcionamiento del metabolismo celular.

En situaciones de estrés fisiológico, como hipoxia, hipoglucemia, falta de aminoá-

cidos esenciales o citoquinas, la célula es capaz de reducir la traducción de proteínas en el RER. En estas situaciones de estrés, diferentes quinasas activadas específicamente por cada tipo de estrés, fosforilan el factor de iniciación de la traducción de eucariotas eIF2 α (Figura 4). La fosforilación ocurre en la serina 51 y atenúa la traducción de ARN mensajero (ARNm) a proteína, por lo que sirve como control de síntesis de nuevas proteínas no necesarias para la supervivencia celular (Proud, 2007). Entre las diferentes quinasas que fosforilan eIF2 α destacan cuatro principales: PKR (proteína quinasa inducida por ARN de doble hebra), GCN2 (control general no desreprimible 2), PERK (quinasa del retículo endoplásmico similar a PKR) y HRI (inhibidor regulado por el grupo hemo). PKR se activa por citoquinas y factores de crecimiento como PDGF, mientras que GCN2 lo hace por falta de nutrientes, PERK por hipoxia e hipoglucemia, y HRI por choques osmóticos y térmicos y por deficiencia del grupo hemo (Williams, 1999; Lu et al., 2001; Wek et al., 2006). Se ha comprobado que, tras una lesión medular, se activa rápidamente la respuesta al estrés por parte de eIF2 α , que pasará a estado fosforilado. Estos mecanismos de estrés y otros que implican al RE llevan a una situación de apoptosis, que propicia la muerte celular y la inhibición de la neuritogénesis (Chen et al., 2006; Penas et al., 2007). Cuando la situación de estrés finaliza, eIF2 α es desfosforilado por la serin/treonin fosfatasa PP1, restaurando así la traducción de proteínas del RER a su estado normal. Por ello, la fosforilación y desfosforilación de eIF2 α asegura un control de la síntesis y secreción de proteínas del RER acorde con los cambios que ocurren en el microambiente celular, como es el microambiente tras la lesión.

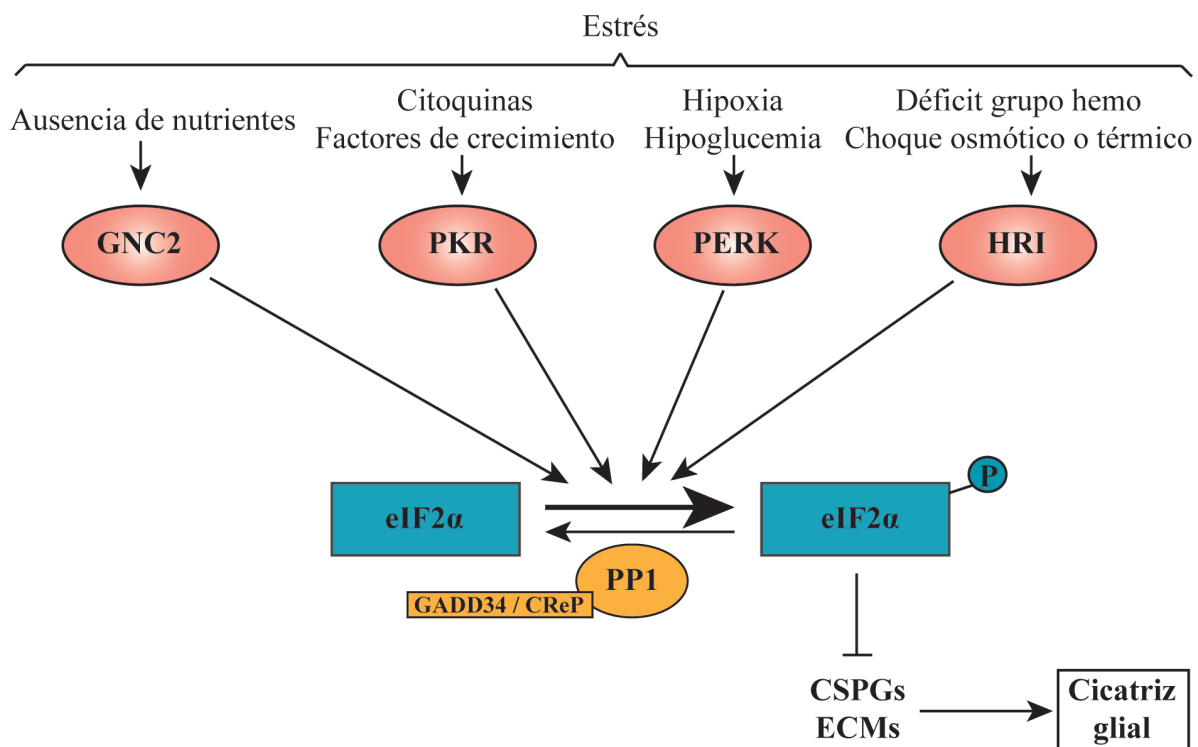


Figura 4 (página anterior): Fosforilación de eIF2 α después de una situación de estrés. Cuando se ha producido una situación que causa estrés en el RE, las quinasas GNC2, PKR, PERK y HRI fosforilan el factor eIF2 α en la serina 51. Cuando esto ocurre, en la célula se atenúa la traducción de ARNm, por lo que se reduce la síntesis de proteínas no necesarias para la supervivencia celular, como los proteoglicanos y proteínas de ECM. Por ello, tras una lesión, la fosforilación de eIF2 α modula la formación de la cicatriz glial.

En modelos de lesión en el SNC se ha descrito tanto el aumento en la expresión de factores de crecimiento y citoquinas inductoras de la expresión de los proteoglicanos (como TGF β y EGF), como la expresión de citoquinas que inhiben su expresión, y ambos coinciden temporal y espacialmente en la zona de la lesión (Bareyre and Schwab, 2003). Un ejemplo de ello es que se ha visto que, en cultivos de astrocitos, el PDGF o la IL-1 son capaces de promover la transcripción del proteoglicano neurocán al activar a PKR, pero sin embargo pueden inhibir su expresión y secreción proteica (Asher et al., 2000; John et al., 2005). Actualmente, aún no se conoce cómo conviven y regulan estos dos sistemas de inducción e inhibición de la expresión de proteoglicanos para formar la cicatriz glial. Los diferentes tipos de estrés capaces de inducir la fosforilación de eIF2 α , como, por ejemplo, la inflamación (que genera grandes cantidades de citoquinas y factores de crecimiento) o la isquemia (que produce regiones de la lesión carentes de oxígeno y nutrientes), ocurren en las lesiones del SNC. Por ello, cualquier droga capaz de mantener eIF2 α en su estado fosforilado sería un buen inhibidor de la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas de ECM y, por tanto, inhibiría o modularía la formación de la cicatriz glial.

6.1 Salubrinal

Recientemente se ha comprobado que tratamientos con drogas inhibidoras del estrés del RE son eficaces en la inhibición de la muerte de neuronas en cultivo y en modelos animales de isquemia/reperfusión, reduciendo el área de infarto y la inflamación. Entre estas moléculas destacan el Salubrinal, las sales biliares Ursodeoxicolato sódico (UDCA) y Tauroursodeoxicolato sódico (TUDCA), y el 4-fenilbutirato sódico (4PBA) (Rodrigues et al., 2002; Rodrigues et al., 2003; Qi et al., 2004; Sokka et al., 2007; Yanguas-Casas et al., 2014).

El Salubrinal es una pequeña molécula (C₂₁H₂₀Cl₃N₄OS) de 479,8 Da que fue descubierta en un ensayo para seleccionar moléculas protectoras de muerte celular inducida por el estrés del RE en la línea celular PC-12 (Boyce et al., 2005). Atraviesa la BHE, y su administración está probada de manera subcutánea, intraperitoneal e intravenosa. Además, al ser una molécula sintética muy pequeña, podría administrarse de forma oral, en forma de píldora. Por otro lado, se ha comprobado su eficacia en modelos animales al acelerar el

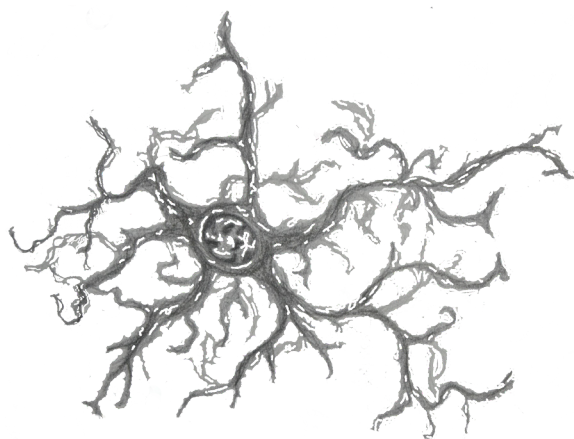
proceso de curación de heridas de fémur y al favorecer la formación de hueso en animales con osteoporosis (Zhang et al., 2012; Yokota et al., 2013).

El Salubrinal modula el estrés del RE mediante el mantenimiento de la fosforilación de eIF2 α en la serina 51. Para ello se une los cofactores no enzimáticos de la fosfatasa PP1, GADD34 o CReP. Esta unión hace que PP1 deje de ser funcional y no desfosforila a eIF2 α , manteniéndolo en su estado fosforilado y reduciendo así la traducción de proteínas secretoras en el RE (Figura 4) (Boyce et al., 2005).

En diversos estudios se ha comprobado que, gracias a su efecto sobre la modulación de la fosforilación de eIF2 α , tiene un efecto protector sobre las células. Por un lado, al atenuar el malplegamiento de proteínas por parte del RE, reduce el consumo energético celular, promoviendo la supervivencia e inhibiendo la apoptosis de cardiomiocitos tras un daño por hipoxia (Liu et al., 2012). En células del sistema nervioso protege de la muerte a los oligodendrocitos tras una lesión medular, mejorando la coordinación en ratones lesionados (Ohri et al., 2013). Por último, también tiene efectos neuroprotectores en animales que han sufrido daños por isquemia/reperfusión, hipoxia o toxicidad por glutamato (Zhu et al., 2008; Lewerenz and Maher, 2009; Nakka et al., 2010).

Por todo ello, el tratamiento de lesiones en el SNC con esta droga (Salubrinal) podría tener un doble efecto beneficioso, neuroprotector y modulador de la cicatriz glial, y, por tanto, promover la reparación funcional.





Objetivos

Objetivos

Tras una lesión mecánica severa en el SNC se forma en el tejido afectado una cicatriz que restablece la homeostasis tisular. Sin embargo, dicha cicatriz glial también es un impedimento químico y físico para la regeneración axonal y, por tanto, para la recuperación funcional. El Salubrinal es una droga que modula la síntesis de proteínas secretadas en el RE, tan importantes en la formación de la cicatriz glial. Por tanto, además del papel neuroprotector ya demostrado en estudios previos, en el laboratorio nos planteamos el posible efecto modulador del Salubrinal sobre la cicatriz glial producida tras una lesión mecánica en el SNC.

El objetivo general del proyecto consistió en estudiar el efecto de la droga Salubrinal en la modulación de la reactividad glial y en la formación de la cicatriz. Para abordar dicho estudio, se llevaron a cabo dos aproximaciones. En la primera de ellas se analizó el efecto del Salubrinal en modelos *in vitro* en los que se utilizaron cultivos de astrocitos, componentes característicos de la cicatriz glial. A continuación, se evaluó el efecto del Salubrinal en un modelo *in vivo*, en el que se practicó una lesión lacerante en la corteza cerebral de ratones adultos.

Así, el objetivo general del proyecto se divide en tres objetivos específicos:

1. Análisis del efecto del Salubrinal sobre la transcripción génica, expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas de ECM inducidos por factores de crecimiento en cultivos de astrocitos.
2. Evaluación del efecto del Salubrinal en un modelo *in vitro* de cicatriz glial y sus posibles efectos sobre el crecimiento neurítico.
3. Determinación del patrón de expresión celular y espacio-temporal de la reactividad glial tras una lesión mecánica en un modelo animal de cicatriz glial. Efecto del Salubrinal sobre la reactividad glial y modulación de la cicatriz formada tras la lesión.



Material y Métodos

1. Material

1.1 Animales

- Ratones macho *Mus musculus* de la cepa C57BL/6 (Harlan® Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, España), de 8 a 10 semanas de edad y un peso entre 25 y 30 gramos.

- Ratones machos o hembras *Mus musculus* de la cepa transgénica SBE/Tk-luc (The Jackson Laboratory, Maine, Estados Unidos), de 8 a 10 semanas de edad y un peso entre 25 y 30 gramos.

- Ratones *Mus musculus* embrionarios (estadio E17-E18) y postnatales (estadio P0-P2) de la cepa C57BL/6, obtenidos en el bioterio del Instituto Cajal, CSIC.

- Ratas *Rattus norvegicus* postnatales (estadio P0-P2) de la cepa Wistar, obtenidas en el bioterio del Instituto Cajal, CSIC.

1.2. Reactivos

1.2.1. Reactivos para modelos *in vivo*

- Hidrato de cloral (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Sulfato de magnesio (Merck)
- Propilenglicol (Panreac, Castellar del Valles, España)
- Alcohol etílico (Merck)
- Evans Blue (Santa Cruz, CA, USA)
- N,N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos)

1.2.2. Reactivos para cultivos celulares

- B27® Supplements (Gibco, Alcobendas, Madrid, España)

- DNasa (Gibco)
- EGF humano (EGF; PeproTech, London, Reino Unido)
- GlutaMAX™ Supplement (Gibco)
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma-Aldrich)
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM; Lonza, Barcelona, España)
- Medio Neurobasal (Gibco)
- Medio Opti-MEM® (Gibco)
- Medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; Sigma-Adrich)
- Penicilina/estreptomicina (P/S; Sigma-Aldrich)
- Poli-L-lisina (PLL; Sigma-Aldrich)
- Suero de caballo (HS; Gibco)
- Suero fetal bobino (SFB; Gibco)
- TGFβ2 humano (TGFβ; PeproTech)
- Tripsina (Sigma-Aldrich)

1.2.3. Reactivos para biología celular

- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Adrich)
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Fluka, Sigma-Adrich)
- Reactivo de Griess (Sigma-Adrich)

1.2.4. Reactivos para biología molecular

- Ácido okadaico (Calbiochem, La Jolla, CA, Estados Unidos)
- Acrilamida (Sigma- Aldrich)
- Adenosín trifosfato (ATP; Sigma-Aldrich)
- Albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich)
- Alcohol etílico o etanol (Merck)
- Alcohol isopropílico (Merck)
- Alcohol metílico o metanol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos)
- Azida de sodio (NaN_3 ; Sigma-Aldrich)
- Azul de bromofenol (Sigma- Aldrich)
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro sódico (NaCl ; Merck)
- Cocktail Inhibidor de Fosfatasas (PhosSTOP; Roche)
- Cocktail Inhibidor de Proteasas (cOmplete Mini; Roche)
- Coelenterazina (Syn Chem OHG, Felsberg, Alemania)
- Coenzima A (Sigma-Aldrich)
- Desoxirribonucleasa I (DNasa I; Fermentas)
- Dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich)

- Dithiothreitol (DTT; Fluka, Sigma-Aldrich)
- D-Luciferina (Syn Chem OHG)
- Dodecil sulfato sódico (SDS; Sigma-Aldrich)
- Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4 ; Merk)
- Glicerol (Sigma-Aldrich)
- Glicina (Merck)
- Kit RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Vilnius, Lituania)
- Leche desnatada en polvo (Sveltesse, Nestlé, Barcelona, España)
- NP-40 (Fluka, Sigma-Aldrich)
- PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)
- Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, Estados Unidos)
- Persulfato amónico (APS; Sigma-Aldrich)
- Power SYBR[®] Green (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido)
- Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich)
- Reactivo de Bradford (BIO-RAD, Alcobendas, Madrid, España)
- Reactivo de transfección XtremeGENE 9 DNA (Roche, Madrid, España)
- Reactivo quimioluminiscente SuperSignal[®] West Pico (Thermo Scientific, Alcobendas, Madrid, España)
- Sal sódica de etilendiaminotetraacético (Na_2EDTA ; Merck)

- TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich)
- Tris HCl (Roche)
- TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos)
- Tween 20 (Merck)
- β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)

1.2.5. Reactivos para inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

- 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB; Fluka, Sigma-Aldrich)
- Albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich)
- Alcohol etílico o etanol (Sigma-Aldrich)
- Azida de sodio (Sigma-Aldrich)
- Complejo de amplificación de señal avidina-biotina-peroxidasa Vectastain Elite ABC (Vector Labs, Burlingame, CA, Estados Unidos)
- DePeX (BDH, Poole, England)
- Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama, Estados Unidos)
- Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)
- Kit de amplificación de tiramida TSATM Biotin System (PerkinElmer, Tres Cantos, Madrid, España)
- Alcohol metílico o metanol (Thermo Fisher)
- Paraformaldehído (Merck)

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂; Sigma-Aldrich)
- Sacarosa (Merck)
- Suero normal de cabra (Gibco)
- Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Países Bajos)
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Merck)
- Violeta de cresilo (Sigma-Aldrich)
- Xileno (Merck)

1.3. Compuestos

1.3.1. Drogas

- Deferoxamina (DFO; Sigma-Aldrich)
- D-Luciferina Firefly (Caliper; Madrid, España)
- Heparina sódica (Chiesi, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España)
- Interferón γ humano (IFN γ , PeproTech)
- IsoFlo® (Isoflurano, Esteve Veterinaria, Barcelona, España)
- Lipopolisacárido bacteriano de Escherichia coli, isotipo 026:B6 (LPS; Sigma-Aldrich)
- Pentobarbital sódico (Vétoquinol, Madrid, España)
- Sal003, eIF-2 α Inhibitor II (Salubrinal; Calbiochem)

- Solución salina (Grifols, Coslada, Madrid, España)

1.3.2. Plásmidos

- Plásmido reportero acoplado a luciferasa de luciérnaga: Smad2/3 (CAGA-luc; Laboratorio Dr. Santiago Lamas, Laboratorio de Biopatología de la Pared Vascular. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid).
- Plásmido de luciferasa de pensamiento de mar (Renilla) pSV40-Renilla (Promega, Madison, WI, Estados Unidos)

1.4. Oligonucleótidos

Nombre	GenBank ID	Tamaño (pb)	Cebador hacia delante (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
Asparagina sintetasa	NM_012055	65	aactgctgctttggctttcac	cttatcggtgcattccaaac
Brevicán	NM_001109758	77	ccatccagaaccacagaga	accaccactccgtaattcc
CPF	NM_001001566	66	gccctgcctcacgcttt	cgcaggagaacgcgtattgt
CTGF	NM_010217	62	cagcggtgagtccttcaaa	ccacggccccatcca
Fosfacán	NM_001081306	101	tctcgcgtgcgttcag	ataggaccagccaatctcttca
GFAP	NM_010277	85	accgcatcaccattcctgtac	tggccttctgacacggattt
IL-1β	NM_008361	74	ctggtgtgacgttccatta	ccgacagcacgaggttt
IL-6	NM_031168	76	tagtcttctaccccaatttc	ttggctcttagccactccttc
Neurocán	NM_007789	83	cggatgaagtggactaaggtt	cgcaccacgttgtctttgg
RPS29	NM_009093	54	gccgcgtctgctcaa	acatgttcagcccgtatttgc
XylT-1	NM_175645	58	gagaaagccacaggcaacagt	tggcatggctgtgtcttga

Tabla 1: Cebadores empleados en el estudio y evaluación de la expresión transcripcional para diferentes genes de las muestras. Información detallada de los cebadores empleados en la técnica de PCR cuantitativa. De izquierda a derecha se detalla el nombre del gen, la identificación en la base de datos del GenBank, el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases y las secuencias 5'-3' de los cebadores hacia delante y reversos.

1.5. Anticuerpos

1.5.1. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Antibody Registry ID	Hospedador	Dilución	Casa Comercial
α-Tubulina	AB_1841230	Ratón	1:2000	Sigma-Aldrich
β III-Tubulina	AB_2210524	Ratón	1:500	Millipore (Billerica, MA, Estados Unidos)
Arginasa 1	AB_2227469	Cabra	1:200	Santa Cruz
Brevicán	AB_398211	Ratón	1:1000	BD Biosciences (Madrid, España)
CD16/CD32	AB_394656	Rata	1:400	BD Pharmingen (San Jose, CA, Estados Unidos)
ColIV	AB_305584	Conejo	1:200	Abcam
CS56	AB_476879	Ratón	1:250	Sigma-Aldrich
CTGF	AB_638805	Cabra	1:100	Santa Cruz
e-IF2α-P (ser51)	AB_732117	Conejo	1:500	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
Fibronectina	AB_447655	Conejo	1:200	Abcam
GFAP	AB_10013382	Conejo	1:2000	Dako (Barcelona, España)
GFAP	AB_477035	Ratón	1:200	Dako
Iba1	AB_839504	Conejo	1:2000	Wako (Osaka, Japón)
Iba1	AB_2493179	Cobaya	1:500	Synaptics Systems (Goettingen, Alemania)
Neuronal Nuclei (NeuN)	AB_11210778	Ratón	1:500	Millipore
Neurocán	AB_2149716	Oveja	1:100	R&D Systems (Reino Unido)
PDGF-B	AB_10859010	Conejo	1:100	Bioss (Woburn, MA, Estados Unidos)

Tabla 2: Anticuerpos primarios. De izquierda a derecha se detalla el nombre del anticuerpo, la identificación en la base de datos del Antibody Registry, el animal hospedador del cual se obtuvo el anticuerpo, la dilución utilizada en la técnica y la casa comercial donde se adquirieron los anticuerpos.

1.5.2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Antibody Registry ID	Hospedador	Dilución	Casa Comercial
α - IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano	AB_10015289	Cabra	1:2000	Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA)
α - IgM de ratón conjugada con peroxidasa de rábano	AB_2338502	Cabra	1:5000	Jackson Immunoresearch
α - IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano	AB_2307391	Cabra	1:10000	Jackson Immunoresearch
α - IgG de cabra conjugada con peroxidasa de rábano	AB_2340390	Burro	1:1000	Jackson Immunoresearch
α - IgG de ratón conjugada con biotina SP	AB_2338572	Cabra	1:2000	Jackson Immunoresearch
α - IgG de conejo conjugada con biotina SP	AB_2336930	Cabra	1:500	Jackson Immunoresearch
α - IgG de rata conjugada con biotina SP	AB_2338172	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
α - IgG de cabra conjugada con biotina SP	AB_2340396	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
α - IgG de oveja conjugada con biotina SP	AB_2340716	Burro	1:500	Jackson Immunoresearch
α - IgG de ratón conjugada con Alexa Fluor [®] 488	AB_141367	Cabra	1:1000	Invitrogen
α - IgG de conejo conjugada con Alexa Fluor [®] 594	AB_10562717	Cabra	1:1000	Life technologies (Alcobendas, Madrid)
α - IgG de cobaya conjugada con Alexa Fluor [®] 488	AB_10562573	Cabra	1:500	Life technologies
Estreptavidina conjugada con Cy3	AB_2337244	-	1:1000	Jackson Immunoresearch

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados. De izquierda a derecha se detalla el nombre del anticuerpo, la identificación en la base de datos del Antibody Registry, el animal hospedador del anticuerpo, la dilución utilizada y la casa comercial donde se compraron los anticuerpos.

1.6. Material de laboratorio

- Aguja de 25G (BD MicrolanceTM 3, BD Biosciences)
- Arrays de anticuerpos para detección de proteínas (Quantibody[®] Mouse Cytokine Array 1, QAM-CYT-1; 20 citoquinas murinas; RayBiotech, Norcross, GA, Estados Unidos)
- Filtro de 3K (Nanosep 3K Omega; Pall, Alcobendas, Madrid, España)
- Membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (Whatman, PROTAN[®], GE Healthcare, Madrid, España)
- Papel Whatman 3MM (Whatman, GE Healthcare)
- Película quimioluminiscente (Amersham HyperfilmTM ECL; GE Healthcare)
- Placa multipocillo para cultivo celular (BD Falcon, BD Biosciences)
- Placa multipocillo para qPCR (Applied Biosystems)
- Rascador (BD Falcon, BD Biosciences)

1.7. Instrumentos

- 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)
- Agitador Minitron (INFORS HT, Suiza)
- Campana de flujo laminar (Steril, Mazzo di Rho, MI, Italia)
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen EBA 12, Tübingen, Alemania)
- Centrífuga 5415 R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
- Criostato Leica CM1900 (Leica, Nussloch, Alemania)

- Cubeta electroforética Mini-PROTEAN[®] Tetra System (BIO-RAD)
- Cubeta de electrotransferencia (Hoefer TE22, Holliston, MA, Estados Unidos)
- Densitómetro GS-800 Calibrated (BIO-RAD)
- Equipo revelador Curix 60 (Agfa, Mortsel, Bélgica)
- Espectrofotómetro de microplacas Multiskan Ascent (Thermo Electron Co., Shanghai, China)
- Espectrofotómetro Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, E.E.U.U.)
- Estereotáxico (David Kopf Instruments, California, Estados Unidos)
- Homogeneizador Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Ika[®]- Labortechnik, Satufen, Alemania)
- In Vivo Imaging System IVIS-Lumina (Xenogen, Alameda, CA. Estados Unidos)
- Incubador (RS Biotech Galaxy S, Escocia, Reino Unido)
- Luminómetro Sirius (Berthold Technologies; Thoyri, Francia)
- Microscopio confocal Leica DMI6000CS (Leica)
- Microscopio invertido Leica DFC 250FX (Leica)
- Microscopio Olympus AX70 (Olympus, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España)
- Sistema confocal Leica TCS-SP5 (Leica)
- Sistema de captura de imagen Olympus DP70 (Olympus)
- Sistema de escaneado Axon GenePix 4000B (Sunnyvale, CA, Estados Unidos)
- Termociclador (T3 Thermocycler; Biometra, Goettingen, Alemania)

1.8. Programas informáticos

- 7500 software v2.0.6 (Applied Biosystems)
- Adobe Photoshop CS5 (Adobe Inc.)
- CellA (Olympus)
- fb12 Sirius Software (Titertek, Reino Unido)
- Gene Runner 3.05 (Hastings Software Inc.)
- GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc.)
- ImageJ (ImageJ 1.48s)
- LAS AF Lite (Leica)
- LIVINGIMAGE Software (Xenogen)
- Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, NCBI)
- Quantity One 4.6.1 (BIO-RAD)

2. Métodos experimentales

2.1. Animales de experimentación

Para la realización de cultivos celulares empleamos tanto embriones (estadio E17-E18) como animales postnatales (estadio P0-P2) de ratón C57BL/6 o de rata Wistar obtenidos en el bioterio del Instituto Cajal, CSIC.

Para el estudio histológico de la lesión y del infiltrado sanguíneo en corteza cerebral utilizamos ratones macho adultos de la cepa C57BL/6, de 8 a 10 semanas de edad y un peso entre 25 y 30 gramos. Los animales fueron mantenidos con alimento y bebida *ad libitum* y ciclos controlados de 12 horas de luz/oscuridad en salas climatizadas de 22°C con 50% \pm 10% humedad relativa, en el bioterio del Instituto Cajal, CSIC.

Para el estudio del efecto de la cicatriz glial sobre la ruta del TGF β utilizamos indistintamente ratones macho o hembras adultos de la cepa transgénica SBE/Tk-luc, de 8 a 10 semanas de edad y un peso entre 25 y 30 gramos. Dichos ratones transgénicos constan de 12 repeticiones del sitio de unión del factor de transcripción Smad2 y, acoplado a ellas, el promotor de luciferasa. Al igual que en el caso anterior, los animales fueron criados y mantenidos con alimento y bebida *ad libitum* y ciclos controlados de 12 horas de luz/oscuridad en salas climatizadas de 22°C con 50% \pm 10% humedad relativa, en el bioterio del Instituto Cajal, CSIC.

Todos los protocolos de manipulación y experimentación animal fueron realizados conforme a la legislación de la Unión Europea (86/609/EU) y la regulación española (BOE 67/8509-12, 1988) para la experimentación animal. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Cajal, CSIC y del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo, SESCAM.

2.2. Cultivos celulares

2.2.1. Cultivo de astrocitos perinatales murinos

Los astrocitos perinatales de corteza de ratón (C57BL/6) fueron cultivados según el modelo descrito por Fedoroff y Richardson (Fedoroff and Richardson, 2001). El tejido de cada uno de los cerebros disgregados mecánicamente fue cultivado en 10 ml de medio Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bobino (SFB) y penicilina/estreptomicina (P/S), a 37°C y 5% CO₂, en frascos de cultivo de 75 cm²

recubiertos previamente con 10 µg/ml de poli-L-lisina (PLL). Una vez que el cultivo glial mixto alcanzó la confluencia (normalmente a los 10 días desde el inicio del cultivo), fue agitado a 280 rpm durante una noche a 37°C, seguido de un proceso de lavado con PBS y tripsinización de las células adheridas, obteniendo así un cultivo enriquecido en astrocitos. Las células disociadas fueron centrifugadas a 168 x g durante 10 minutos y el pellet obtenido de las células disociadas fue sembrado en placas de cultivo multipocillo.

2.2.2. Cultivo de fibroblastos perinatales murinos

Para cultivar fibroblastos perinatales de ratón (C57BL/6) extrajimos las meninges corticales de ratones postnatales (estadío P0-P2) y las sometimos a disgregación mecánica y química con tripsina en HBSS durante 25 minutos a 37°C. La suspensión de células obtenidas fue cultivada en medio DMEM completo (ver apartado anterior) en frascos de cultivo de 75 cm² recubiertos previamente con PLL. Una vez que el cultivo llegó a confluencia (normalmente a los 7 días de inicio del cultivo), realizamos un lavado con PBS, tripsinizamos y centrifugamos a 168 x g durante 10 minutos. El pellet de las células disociadas fue sembrado en placas de cultivo multipocillo.

2.2.3. Cultivo de microglía perinatal de rata

Las células microgliales de rata (Wistar) fueron obtenidas de la corteza cerebral de ratas postnatales (estadío P0-P2). El cultivo fue realizado según las modificaciones del protocolo de McCarthy y de Vellis (McCarthy and de Vellis, 1980), realizadas por Mecha y colaboradores (Mecha M, 2011). Las cortezas fueron disgregadas mecánicamente en HBSS y cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 10% de suero de caballo y P/S (DMEM 10:10:1), a 37°C y 5% CO₂, en frascos de cultivo de 75 cm² recubiertos previamente con 10 µg/ml de PLL. Tras llegar a confluencia, en el cultivo glial mixto fue agitado a 230 rpm durante 3 horas a 37°C y las células desprendidas fueron centrifugadas y sembradas en placas de cultivo multipocillo, obteniendo así un cultivo enriquecido en microglía.

2.2.4. Cultivo de neuronas corticales embrionarias murinas

Los cultivos de neuronas corticales procedentes de ratones embrionarios (E17 - E18, C57BL/6) fueron obtenidos de corteza cerebral de ratones extraídos mediante disección directa del útero materno. La corteza cerebral murina fue disociada con tripsina (10%) y DNAsa (20 mg/ml) en DMEM durante 15 minutos a 37°C. A continuación, realizamos una disgregación mecánica y las células fueron cultivadas en medio DMEM completo en placas de cultivo multipocillo previamente tratadas con PLL. Tras 3 horas de incubación, el medio

fue cambiado a medio Neurobasal suplementado con B27[®] Supplements (2% v/v), Gluta-MAX[™] Supplement (1% v/v) y P/S, e incubado a 37°C y 5% CO₂.

2.3. Técnicas de biología celular

2.3.1. Determinación de la viabilidad celular por el método de reducción de MTT

La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de reducción a formazán del compuesto MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Las células (astrocitos, fibroblastos, neuronas y microglía) fueron sembradas en placas de 96 pocillos previamente tratadas con PLL a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en medio de cultivo DMEM completo (excepto las neuronas, que fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en Neurobasal suplementado). Al día siguiente, las células se dejaron en medio sin suero o a bajo suero (según el tipo celular) durante varias horas, tiempo tras el cual fueron realizados los tratamientos específicos para cada caso. Tras 24, 48 o 72 horas de tratamiento, el medio de cultivo fue retirado, añadiendo una solución de MTT (0,5 µg/µl) en RPMI 1640 sin rojo fenol con el fin de evitar interferencias en la posterior medida de absorbancia, durante 3 horas a 37°C, 5% CO₂. A continuación, fue retirado el medio de incubación y el formazán precipitado fue solubilizado adicionando 100 µl/pocillo de DMSO (dimetilsulfóxido). La absorbancia de los pocillos tratados fue medida a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas Muliskan Ascent. Los datos de absorbancia fueron referidos al control interno de la placa (pocillos sin células).

Para el caso de los astrocitos, las células se dejaron en medio DMEM + 1% SFB durante 6 horas y, posteriormente, fueron pretratadas con 5 o 10 µM de Sal003 durante 1 hora y luego con 10 ng/ml de TGFβ o EGF durante 24 y 72 horas. Los fibroblastos se dejaron en medio sin suero O/N y fueron tratados con 5 µM de Sal003 durante 48 horas. Las neuronas fueron pretratadas con 2 o 5 µM de Sal003 en Neurobasal durante 1 hora y luego con 5 ng/ml de TGFβ durante 48 horas. La microglía fue incubada en medio RPMI 1640 con 0,1% SFB durante 2 horas, tiempo tras el cual fue pretratada con concentraciones crecientes de Sal003 (0,5, 1, 2, 5 y 10 µM) en RPMI 1640 con 5% SFB, y luego con 10 ng/ml de LPS durante 24, 48 o 72 horas.

2.3.2. Determinación de la producción de nitritos en cultivos celulares

Las células microgliales fueron sembradas en placas de 96 pocillos previamente tratadas con PLL a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en medio de cultivo DMEM

completo. Al día siguiente, las células se dejaron en medio DMEM con 0,1% SFB durante 2 horas. Tras ello, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de Salubrinal (0,5, 1, 2, 5 y 10 μ M) en medio RPMI 1640 sin rojo fenol con 5% FBS durante 1 hora, y después fue añadido LPS (10 ng/ml) durante 24, 48 o 72 horas. Como control positivo de la producción de nitritos, las células fueron tratadas 200 ng/ml de LPS. Tras el tiempo de incubación con los diferentes tratamientos, el sobrenadante fue recogido y mezclado en una proporción 1:1 con el reactivo modificado de Griess y se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro de microplacas Muliskan Ascent.

2.4. Técnicas de biología molecular

2.4.1. Transfección transitoria y actividad de reporteros acoplados a luciferasa en cultivos de astrocitos

Los astrocitos fueron sembrados a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos previamente tratadas con PLL, en medio de cultivo DMEM completo. Al día siguiente, las células astrogiales fueron incubadas con una mezcla de transfección compuesta de plásmido reportero acoplado a luciferasa de luciérnaga (0,2 μ g/pocillo), plásmido de luciferasa pSV40-Renilla que expresa constitutivamente la luciferasa de Renilla (50 ng/pocillo) como control de eficacia de la transfección, y el reactivo de transfección XtremeGENE 9 DNA (0,4 μ L/pocillo), en medio Opti-MEM[®] y de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante. En nuestro caso, el plásmido reportero acoplado a luciferasa fue el CAGA-luc, que consta de 12 repeticiones del sitio de unión de los factores de transcripción Smad2/3.

Después de 24 horas de incubación, la mezcla de transfección fue retirada de los pocillos y las células se dejaron en medio DMEM + 1% SFB + P/S durante 24 horas. Tras ello, los astrocitos fueron pretratados con 5 o 10 μ M de Sal003 durante 1 hora, seguido de 5 ng/ml de TGF β durante 24 horas. Después de los tratamientos, el medio fue aspiado y se añadieron 50 μ l/pocillo de 1x Passive Lysis Buffer. Las placas de cultivo fueron selladas con parafilm y guardadas a -80°C hasta que se realizó la medida de luciferasa.

Para evaluar la transfección, las placas fueron descongeladas y, de cada uno de los pocillos, se realizó una lectura dual en un luminómetro Sirius, mediante un método de detección dual de la actividad luciferasa de luciérnaga y de la actividad luciferasa de Renilla puesto a punto en nuestro laboratorio. Para ello, fueron añadidos 50 μ l de reactivo Luciferasa (7,5 μ l 2x Firefly Luciferasa buffer; 282 μ l D-Luciferina; 150 μ l Coenzima A; 80 μ l 100 mM ATP) a cada pocillo, se midió la bioluminiscencia, se volvió a añadir 100 μ l de reactivo

Renilla (1,1 M NaCl; 2,2 mM Na₂EDTA; 0,22 M K₂HPO₄; 0,44 mg/ml BSA; 1,3 mM NaN₃; 1,43 μ M coelenterazina), y se volvió a medir la bioluminiscencia. La actividad del reportero CAGA-luc fue determinada en cada uno de los casos como la relación entre la actividad luciferasa de luciérnaga / actividad luciferasa de Renilla, gracias al programa fb12 Sirius Software.

2.4.2. Determinación por electroforesis, transferencia e inmunodetección (Western blot) de la expresión y secreción de proteínas

Las células fueron sembradas a una densidad de 6×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos previamente tratadas con PLL, en medio de cultivo DMEM completo. Al día siguiente, las células astrogiales fueron incubadas en medio DMEM + 1% SFB durante 6 horas, tras lo cual fueron pretratadas con 5 o 10 μ M de Sal003 durante 1 hora y luego con 10 ng/ml de TGF β o EGF durante 24 o 72 horas.

Tras 24 horas de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS estéril, se añadió 100 μ l/pocillo de tampón de lisis (50 mM Tris HCL pH=7,6; 137 mM NaCl; 0,5 mM DTT; 1% cocktail Inhibidor de Proteasas; 1% cocktail Inhibidor de Fosfatasas; 1% NP-40; 0,2% SDS; 0,5 μ M Okadaico) a 4°C y las células fueron levantadas de los pocillos con un rasgador. Las muestras fueron conservadas a - 80°C hasta el proceso de electroforesis. Antes de realizarlo, las muestras se pasaron por una jeringa de 25G, se cuantificó la concentración de proteínas del extracto (Bradford, 1976) y los lisados de proteína fueron desnaturalizados mediante una incubación a 100°C durante 5 minutos en tampón de carga (1 M Tris HCl pH=6,8; 1% SDS; 0,5% Glicerol; 0,005% azul de bromofenol).

En el caso de la evaluación de la secreción de proteínas, fueron utilizados como muestras los sobrenadantes de las células astrogiales cultivadas y tratadas durante 72 horas. Dichos sobrenadantes fueron concentrados con filtros de 3K y solubilizados en tampón de carga durante 5 minutos a 100°C (ver párrafo anterior).

Para la electroforesis SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide-Gel-Electrophoresis) se prepararon geles de poliacrilamida con fase concentradora y fase separadora, y con diferente tamaño de poro (fase separadora 6 - 12% poliacrilamida), dependiendo del rango de proteínas a separar. La electroforesis tuvo lugar en cubetas Mini-PROTEAN[®] Tetra System a temperatura ambiente, cargando 20 - 50 μ g de proteína/pocillo en un tampón de electroforesis Tris-Glicina (0,1% SDS; Glicina). Paralelamente un patrón de pesos moleculares quimioluminiscente PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder fue aplicado para la identificación de proteínas.

Una vez separadas por electroforesis SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido. Para ello, el gel de poliacrilamida fue colocado sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μm y la transferencia fue realizada colocando a ambos lados papel Whatman 3MM y esponjas porosas. Todo ello fue colocado en unos soportes de plástico que fueron sumergidos en una cubeta de electrotransferencia Hoefer TE22 con un tampón de transferencia Tris-Glicina (Tris HCl; 192 mM glicina; 2% metanol) y se transfirió durante toda la noche a 4°C, aplicándose una intensidad de corriente de 140 mA.

Tras completar el proceso de transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa, se comprobó la presencia de proteínas en dicha membrana mediante una tinción con el colorante Rojo Ponceau. Tras sucesivos lavados con el tampón TBST (TBS + 0,1% Tween 20) y el tampón TBS, los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con una solución bloqueante compuesta por leche desnatada (5%, en PBST) durante 1 hora a temperatura ambiente y, a continuación, las membranas fueron incubadas en agitación con el anticuerpo primario (Tabla 4) disuelto en solución bloqueante durante toda la noche y a 4°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas en TBST y TBS e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano (HRP; Tabla 5) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Para finalizar, la señal fue detectada incubando la membrana con reactivo quimioluminiscente SuperSignal[®] West Pico según las especificaciones del fabricante. A continuación, la señal fue capturada con una película quimioluminiscente y un equipo revelador Curix 60, y se realizó un análisis densitométrico de las bandas con el densitómetro GS-800 Calibrated y con el programa informático Quantity One 4.6.1.

Anticuerpo	Antibody Registry ID	Hospedador	Dilución	Peso Molecular (KDa)	Casa Comercial
α-Tubulina	AB_1841230	Ratón	1:2000	55	Sigma-Aldrich
Brevicán	AB_398211	Ratón	1:1000	140	BD Biosciences
CS56	AB_476879	Ratón	1:250	250-150	Sigma-Aldrich
CTGF	AB_638805	Cabra	1:100	38	Santa Cruz
e-IF2α-P (ser51)	AB_732117	Conejo	1:500	36	Abcam

Tabla 4: Anticuerpos primarios utilizados en la expresión y secreción de proteínas mediante la técnica de Western blot. De izquierda a derecha se detalla el nombre del anticuerpo, la identificación en la base de datos del Antibody Registry, el animal hospedador del cual se obtuvo el anticuerpo, la dilución utilizada en la técnica, el peso molecular (expresado en KiloDalton) de la banda obtenida y la casa comercial donde se adquirieron los anticuerpos.

Anticuerpo	Antibody Registry ID	Hospedador	Dilución	Casa Comercial
α- IgG de ratón conjugada con peroxidasa de rábano	AB_10015289	Cabra	1:2000	Jackson Immunoresearch
α- IgM de ratón conjugada con peroxidasa de rábano	AB_2338502	Cabra	1:5000	Jackson Immunoresearch
α- IgG de conejo conjugada con peroxidasa de rábano	AB_2307391	Cabra	1:10000	Jackson Immunoresearch
α- IgG de cabra conjugada con peroxidasa de rábano	AB_2340390	Burro	1:1000	Jackson Immunoresearch

Tabla 5: Anticuerpos secundarios utilizados en la expresión y secreción de proteínas mediante la técnica de Western blot. De izquierda a derecha se detalla el nombre del anticuerpo, la identificación en la base de datos del Antibody Registry, el animal hospedador del anticuerpo, la dilución utilizada y la casa comercial donde se compraron los anticuerpos.

2.4.3. Evaluación por RT-qPCR de la actividad génica transcripcional

Las células fueron sembraron a una densidad de 6×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos previamente tratadas con PLL, en medio de cultivo DMEM completo. Al día siguiente, dejamos los astrocitos en medio DMEM + 1% SFB durante 6 horas y, a continuación, fueron pretratados con Sal003 (5 o 10 μ M) durante 1 hora y luego con 10 ng/ml de TGF β o EGF durante 24 horas.

Para la extracción de muestras de ARN de cultivos de astrocitos murinos el reactivo TRIzol (0,5 ml) fue añadido y las células fueron lisadas y homogeneizadas con un rascador. Las muestras fueron conservadas a – 80°C hasta el proceso de extracción de ARN. Una vez llegado el momento, separamos las fases (proteína/ADN, ARN) con cloroformo, precipitamos con alcohol isopropílico y lavamos con etanol al 75%. El ARN obtenido fue resuspendido en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para inhibir las RNasas y cuantificado por absorbancia (260 nm) en un espectofotómetro Nanodrop.

Las muestras de ARN fueron transformadas en ADNc de doble hebra mediante la síntesis de la hebra complementaria utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), empleando el kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis. La mezcla de reacción fue preparada de acuerdo con las indicaciones del fabricante, añadiendo 2 μ g de muestra de ARN en un volumen total de 40 μ l y realizando pasos de retrotranscripción y amplificación en un termociclador T3 Thermocycler. Una vez obtenido el ADNc, la cuantificación del ARNm fue realizada mediante la

amplificación por PCR y detección del ciclo de amplificación en el que se detectaba la señal. El nivel de expresión del ARNm fue determinado utilizando una curva relativa de muestras con dilución conocida. Para ello, y con un volumen de reacción final de 15 µl, las muestras fueron cargadas en una placa multipocillo, se añadió el compuesto orgánico Power SYBR® Green como fluorocromo y fue detectado en el equipo 7500 Real Time PCR System. Para el análisis de datos utilizamos el programa 7500 software v2.0.6. Todos los genes estudiados fueron relativizados al gen constitutivo de la proteína ribosomal S29 (RPS29).

Los cebadores utilizados para los diferentes ARNm (Tabla 6) fueron diseñados mediante la aplicación informática Primer-BLAST. Se seleccionó el par de cebadores con menos estructuras secundarias con el programa Gene Runner 3.05.

Nombre	GenBank ID	Tamaño (pb)	Cebador hacia delante (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
Asparagina sintetasa	NM_012055	65	aactgctgctttggctttcac	cttatcggtgcattccaaac
Brevicán	NM_001109758	77	ccatccagaacccacgaga	accaccactccgtaattcc
CPF	NM_001001566	66	gccctgcctcacgcttt	cgcaggagaacgcgtattgt
CTGF	NM_010217	62	cagcggtagtccttcaaa	ccacggccccatcca
Fosfacán	NM_001081306	101	tcctcgcgtgcgttcag	ataggaccagccaatctcttca
GFAP	NM_010277	85	accgcatcaccattctgtac	tggccttctgacacggattt
IL-1β	NM_008361	74	ctggtgtgacgttccatta	ccgacagcacgaggttt
IL-6	NM_031168	76	tagtccttctacccaatttc	ttggctcttagccactcttc
Neurocán	NM_007789	83	cggatgaagtggactaagggt	cgcaccacgttgctttgg
RPS29	NM_009093	54	gccgcgtctgtcctcaa	acatgttcagcccgtatttgc
XylT-1	NM_175645	58	gagaaagccacaggcaacagt	tggcatggctgtgtcttga

Tabla 6: Cebadores empleados en el estudio de la actividad transcripcional para diferentes genes de las muestras. Información detallada de los cebadores empleados en la técnica de PCR cuantitativa. De izquierda a derecha se detalla el nombre del gen, la identificación en la base de datos del GenBank, el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases y las secuencias 5'-3' de los cebadores hacia delante y reversos.

2.4.4. Análisis de la secreción diferencial de proteínas mediante la técnica de microarray

Las células astrogiales fueron sembradas en medio de cultivo DMEM completo a una densidad de 6×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos previamente tratadas con PLL. Al día siguiente, los astrocitos fueron incubados en medio DMEM + 1% SFB y se dejaron toda la noche. Tras ello, las células fueron pretratadas con 10 µM de Sal003 durante 1 hora

y luego tratadas con 10 ng/ml de TGF β durante 24 horas. Como control positivo de la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) las células fueron tratadas con 100 μ M del inductor de hipoxia deferoxamina (DFO), que aumenta los niveles de VEGF. Como control positivo de las citoquinas inflamatorias se utilizó 1 μ g/ml de LPS junto con 10 ng/ml de interferón γ (IFN γ). Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, el sobrenadante de las células fue recogido y congelado hasta su uso. Además, las células de cada pocillo fueron contadas para luego relativizar la cantidad de proteína secretada al número de células.

Los sobrenadantes fueron concentrados con filtros de 3K hasta un volumen de 100 μ l. Los chips utilizados fueron de array de anticuerpos comerciales (Quantibody[®] Mouse Cytokine Array 1, QAM-CYT-1; 20 citoquinas murinas). Siguiendo las indicaciones del fabricante, un volumen de 100 μ l de cada muestra sobre los chips previamente bloqueados fue incubado durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente los chips fueron lavados e incubados con el anticuerpo de detección conjugado a biotina (2 horas, a temperatura ambiente) y, tras varios lavados, fueron incubados con estreptavidina conjugada a cianina (Cy3) (1 hora, a temperatura ambiente) para completar el proceso de detección de señal. A continuación los chips fueron lavados y secados para escanear las imágenes en un sistema de escaneado Axon GenePix 4000B. Las señales fueron densitometradas y cuantificadas, normalizado los valores a los controles negativos y positivos internos del array. El escaneado, diseño y análisis experimental fueron llevados a cabo por Sara Álvarez López de Rodas, de la Unidad de Genómica – Campus de Moncloa de la Fundación Parque Científico de Madrid.

Los datos de las muestras fueron extrapolados en una curva patrón estandarizada y realizada a partir de un extracto proporcionado en el kit de microarray. Por último, los datos obtenidos fueron referidos a los controles negativos (pocillos de medio sin muestra de proteína) y a la cantidad de células presentes en el pocillo.

2.5. Técnicas estereológicas

2.5.1. Estudio del crecimiento neurítico en un modelo de cicatriz *in vitro*

Para el estudio estereológico del crecimiento neurítico en un modelo de cicatriz *in vitro* utilizamos un cocultivo de astrocitos y fibroblastos tratados con TGF β en el que fueron plaqueadas neuronas sobre ellos, descrito por Kimura-Kuroda y colaboradores (Kimura-Kuroda et al., 2010). Fueron sembradas 5×10^4 células/pocillo de cada tipo celular en placas de 24 pocillos en medio de cultivo DMEM completo. Después de 3 días en los que el cocultivo había recubierto toda la superficie del pocillo, las células fueron pretratadas con 2

o 5 μ M de Sal003 en medio DMEM suplementado con 2% de SFB y 1% de P/S durante 1 hora y, después, fueron tratadas con TGF β (10 o 50 ng/ml) durante 72 horas. A continuación, sobre el cocultivo de astrocitos y fibroblastos, fueron sembradas 2×10^4 neuronas corticales/pocillo en medio completo durante 3 horas. Una vez transcurridas las 3 horas, el medio fue cambiado a Neurobasal[®] Medium con 2% de B27[®] Supplements, 1% de GlutaMAX[™] Supplement y 1% de P/S a 37°C y 5% de CO₂. Tras 48 horas, las células fueron fijadas para realizar a continuación su estudio estereológico.

Una vez fijadas las células, realizamos una tinción inmunocitoquímica para teñir las neuronas y los núcleos celulares (descrito en el apartado de Técnicas inmunocitoquímicas) y se tomaron fotografías. Cada tratamiento fue realizado por duplicado y se tomaron fotografías de 9 campos aleatorios por pocillo en el microscopio, con un aumento de 10x, según describieron Rønn y Ventimiglia (Ventimiglia et al., 1995; Rønn et al., 2000). El experimento fue repetido 4 veces. Para el análisis estadístico, la densidad numérica de las neuronas cultivadas fue estimada utilizando un “counting frame” y relativizada al área total de la fotografía (Gundersen et al., 1988; Ventimiglia et al., 1995), y la longitud de las neuritas de las neuronas fue determinada con el método de Rønn (Rønn et al., 2000), y relativizada al número total de neuronas.

2.6. Aproximaciones *in vivo* en un modelo de lesión en Sistema Nervioso

2.6.1. Modelo de cicatriz glial por lesión mecánica en la corteza cerebral y administración de Salubrinal

El modelo de cicatriz glial *in vivo* consistió en una lesión mecánica en la corteza cerebral de ratones machos adultos de 8 a 10 semanas de edad y un peso entre 25 y 30 gramos de la cepa C57BL/6. Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con 3 ml/kg peso del cóctel anestésico equitesina (compuesto de hidrato de cloral al 4,6%, pentobarbital sódico al 6%, sulfato de magnesio al 2,1%, propilenglicol al 42,8% y etanol al 10,8%) diluido en solución salina. Una vez anestesiados, fueron asegurados en un aparato estereotáxico y se les realizó una incisión a lo largo de la línea media del cráneo, retirando el tejido conjuntivo y muscular, hasta llegar al hueso, donde se realizó una craneotomía para acceder al cerebro. A continuación una aguja de 25G (0,5 mm x 16 mm) fue insertada verticalmente en el hemisferio cerebral derecho. Las coordenadas de inserción fueron anteroposterior (AP) -1.0 mm, mediolateral (ML) -1.0 mm y dorsoventral (DV) -1.7 mm desde bregma, de acuerdo con Paxinos y Franklin (Paxinos and Franklin, 2004). La aguja se mantuvo en esa posición durante 3 minutos, tiempo tras el cual fue retirada sin dañar la masa encefálica. Tras limpiar la zona con suero salino, la incisión en la piel se cerró con seda para

la piel (seda trenzada 5.0). La cirugía fue realizada en condiciones asépticas.

Para determinar el efecto *in vivo* del Salubrinal sobre la cicatriz glial en la corteza cerebral murina se establecieron 4 grupos experimentales en todos los estudios: Control, Control + Salubrinal, Lesión, y Lesión + Salubrinal. Los animales pertenecientes a los grupos Control + Salubrinal y Lesión + Salubrinal fueron tratados con una inyección intraperitoneal de una solución de 1 mg/kg de Sal003 en PBS, eIF-2 α Inhibitor II (Salubrinal).

El efecto del Salubrinal sobre la formación cicatriz glial fue estudiado en un modelo de lesión lacerante en corteza de ratones adultos de la cepa C57BL/6. Estos animales recibieron un tratamiento agudo o crónico de Salubrinal. Los animales con tratamiento agudo recibieron una inyección intraperitoneal diaria durante los 3 días posteriores a la lesión, siendo sacrificados a los 3 días tras la operación (tratamiento agudo, muerte a los 3 días; ver Figura 5) o a los 21 días tras la lesión (tratamiento agudo, muerte a los 21 días; Figura 6). Los animales tratados crónicamente con Salubrinal recibieron diariamente a partir de los 8 días postsesión una inyección intraperitoneal de Salubrinal cada 48 horas. Estos animales fueron sacrificados a los 21 dpl (tratamiento crónico, muerte a los 21 días; Figura 7).

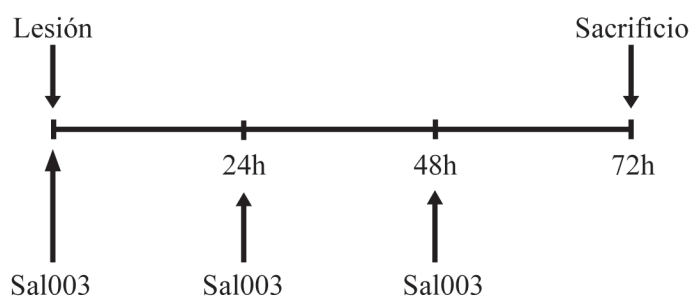


Figura 5: Esquema del protocolo utilizado para el estudio histológico de la cicatriz glial en los animales con tratamiento agudo de Salubrinal y sacrificados a los 3 días tras la lesión. Los animales fueron lesionados y tratados diariamente con Sal003 durante los 3 días posteriores a la operación, siendo sacrificados a continuación.

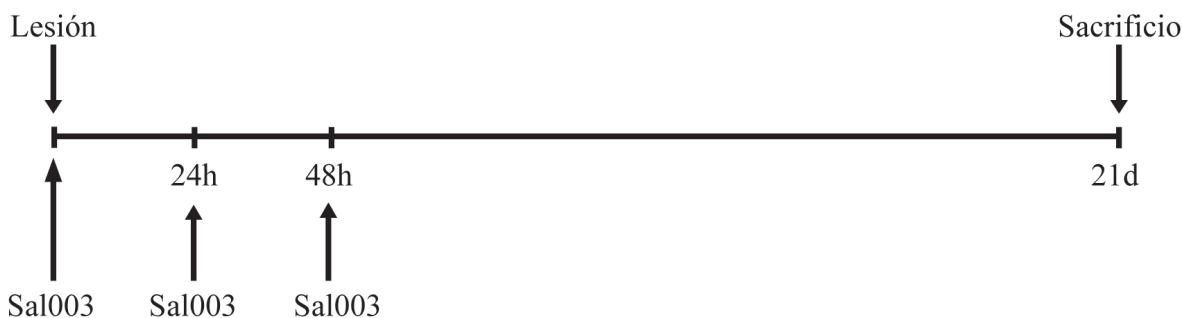


Figura 6: Dibujo esquemático del protocolo utilizado para el estudio histológico de la cicatriz glial en los animales con tratamiento agudo de Salubrinal y sacrificados a los 21 días tras la lesión. Los animales fueron lesionados y tratados diariamente con Sal003 durante los 3 días posteriores a la operación, siendo sacrificados a los 21 días postlesión.

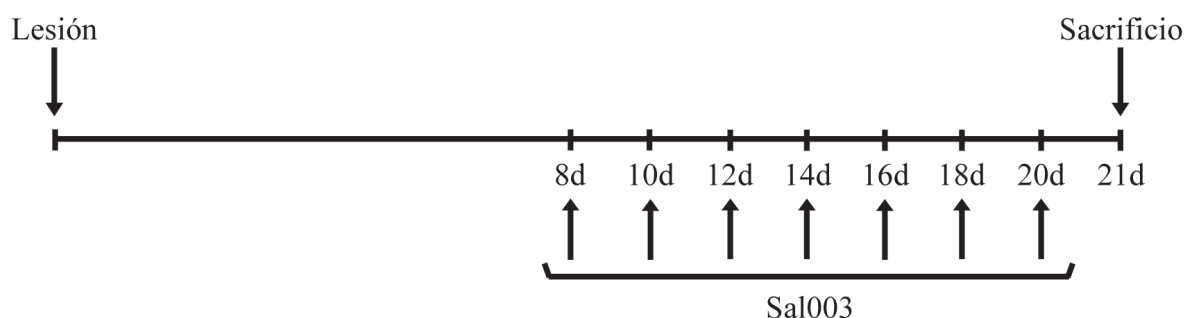


Figura 7: Esquema del protocolo utilizado para el estudio histológico de la cicatriz glial en los animales con tratamiento crónico de Salubrinal y sacrificados a los 21 días tras la lesión. Los animales fueron lesionados y tratados cada 48 horas a partir de los 8 días postlesión. El sacrificio se realizó a los 21 días postlesión.

2.6.2. Estudio del efecto del Salubrinal sobre la ruta del TGF β en una lesión lacerante de corteza cerebral del ratón transgénico SBE/tk-luc

Los ratones transgénicos SBE/Tk-luc fueron genotipados previamente, utilizando para ello los cebadores específicos para la secuencia SBE del transgén (hacia delante, 5'cg-catgccagagatcctatt3'; reverso 5'tacctggcagatggaacctc3'). Estos animales expresan un transgén que contiene 12 repeticiones del sitio de unión de los factores de transcripción Smad2/3 que controlan la expresión de la enzima luciferasa de luciérnaga. Por lo tanto, la activación de la ruta de Smad2/3 (y en consecuencia, la activación de la ruta de TGF β) es proporcional a la actividad luciferasa. Para determinar la actividad luciferasa medida como bioluminiscencia se utilizó un equipo In Vivo Imaging System IVIS-Lumina. Los animales fueron anestesiados con isoflurano y recibieron una inyección intraperitoneal de D-Luciferina (150 mg/kg de animal). Tras esperar 10 minutos para que la D-Luciferina se distribuyese por todo el cuerpo del animal, realizamos la lectura de la bioluminiscencia. Los fotones emitidos fueron adquiridos como fotones por segundo por centímetro cuadrado y por estereorradián, e integrados cada 5 minutos. La representación pseudocolorística del área seleccionada (que fue constante en todos los animales estudiados) fue analizada mediante el programa LIVIN-GIMAGE Software.

La bioluminiscencia basal del cerebro de cada animal fue medida 24 horas antes de practicar la lesión. Esta medida fue utilizada como referencia control para expresar los datos del resto de las medidas como Inducción respecto a la basal de cada uno de los animales. Una vez lesionados (Lesión y Lesión + Salubrinal) y/o tratados diariamente durante los 3 primeros días postlesión (Control + Salubrinal y Lesión + Salubrinal) los grupos experimentales correspondientes, la bioluminiscencia de todos los ratones fue medida a las 4, 24, 48 y 72 horas y a los 7, 14 y 21 días postlesión (Figura 8).

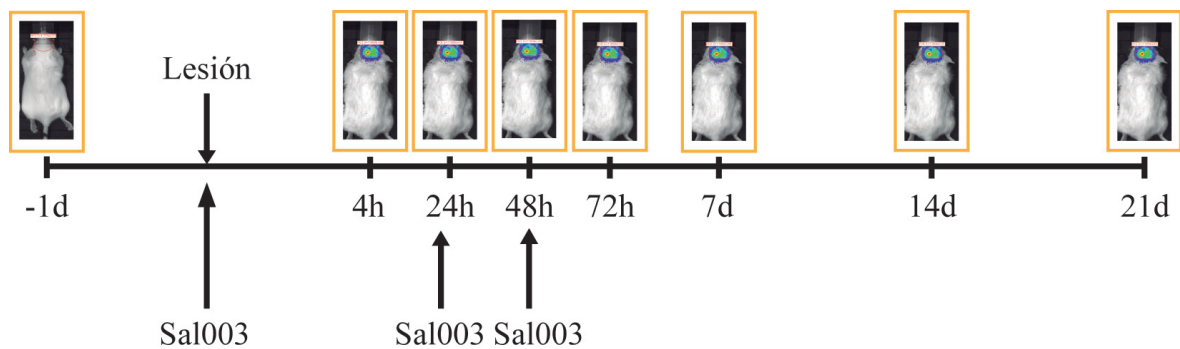


Figura 8: Representación esquemática del protocolo utilizado para estudiar la actividad de la ruta de TGFβ en un modelo cicatriz glial en ratones SBE/tk-Luc. Dibujo esquemático donde se muestran los tiempos en los que se tomó la medida bioluminiscente (un día antes, 4, 24, 48 y 72 horas, y 7, 14 y 21 días) y cuándo se realizaron los tratamientos con Salubrinal (tratamiento agudo durante las 72 primeras horas) respecto al día de la lesión mecánica en un modelo de cicatriz glial.

2.6.3. Medida de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en un modelo de cicatriz glial en la corteza cerebral de ratón

Para la realización de los experimentos utilizamos ratones C57BL/6, estableciendo 4 grupos experimentales: Control, Control + Salubrinal, Lesión, y Lesión + Salubrinal. En este caso a los animales les fue administrado diariamente un tratamiento agudo (durante los 3 días posteriores a la lesión) y se dejaron 14 días hasta su sacrificio. A los 14 días, y 1 hora antes del sacrificio mediante perfusión, los ratones recibieron una inyección en la vena de la cola de una solución al 2% del reactivo colorimétrico Evans Blue disuelto en solución salina con heparina (1:1). Tras una hora, los ratones fueron perfundidos intracardialmente con solución salina y se les extrajo el cerebro, que fue dividido en ambos hemisferios, a los que se les determinó el peso individualmente. A continuación, se añadió a cada hemisferio una proporción 5:1 (μl:mg peso hemisferio) del reactivo N,N-dimetilformamida, en la que el tejido fue homogeneizado. Tras una centrifugación durante 45 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante fue recolectado y se midió su absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Ascent. La cuantificación del infiltrado sanguíneo en la corteza cerebral murina fue determinada mediante la relación de la medida de la absorbancia a 630 nm relativizada al peso en gramos del hemisferio ipsilateral lesionado frente al contralateral sin lesionar.

2.7. Técnicas inmunohistoquímicas e inmunocitoquímicas

2.7.1. Perfusión de los animales y procesamiento de muestras

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (6 mg/kg peso) y perfundidos intracardialmente con solución salina (0,9% NaCl en H₂O, suplementado con 0,08% de heparina sódica al 5%) para retirar la sangre. Seguidamente los animales fueron perfundidos con una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,4 para, finalmente, extraer los cerebros por disección. Los tejidos fueron postfijados en solución fijadora a 4°C durante toda la noche y, a continuación, se crioprotegieron sumergiéndolos en una solución de sacarosa al 30% diluida en tampón fosfato 0,1 M durante 72 horas a 4°C. Por último, las muestras fueron embebidas en medio de congelación Tissue-Tek® y almacenadas a - 20°C hasta su utilización.

Una vez congelados los cerebros, se realizaron secciones coronales de 15 µm de espesor, con un aparato criostato Leica CM1900. Las secciones se montaron en portaobjetos con superficie gelatinizada y se almacenaron hasta su uso a - 20°C.

2.7.2. Fijación de células en cultivo para inmunocitoquímica

Para la detección inmunocitoquímica de epítomos empleamos células crecidas sobre placas de cultivo, previamente recubiertas con 10 µg/ml de poli-L-lisina. Tras realizar tres lavados con PBS estéril, las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos, seguido de sucesivos lavados con PBS y conservación en PBS-Azida 0,1% a 4°C hasta su uso.

2.7.3. Inmunohistoquímica

La detección de proteínas sobre tejido fue realizado en cortes histológicos montados en portas gelatinizados. Empleamos dos tipos de marcaje: inmunohistoquímica simple con diaminobenzidina (DAB) e inmunofluorescencia doble o triple, compartiendo ambas técnicas la mayoría del proceso.

Las secciones fueron lavadas con PBST (PBS + 0,1% Tween 20) y tratadas sucesivamente con solución bloqueante para la peroxidasa endógena (1% metanol, 0,3% H₂O₂ en PBST) durante 30 minutos a temperatura ambiente (paso que fue omitido en fluorescencia), y solución bloqueante de uniones inespecíficas (0,1% BSA, 5% suero de cabra, en PBST) durante 1 hora y a temperatura ambiente. Entre ambos pasos, se realizaron lavados sucesi-

vos de 10 minutos con PBST. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario (o con el mix de anticuerpos primarios en el caso de los comarcajes) (Tabla 7), diluido en solución de bloqueo con PBS + 0,2% Tween 20, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones fueron lavadas con PBST e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado a biotina para la inmunohistoquímica simple (Tabla 8), o con una mezcla de anticuerpos conjugados a Alexa Fluor® en el caso de los comarcajes fluorescentes (Tabla 8). El anticuerpo fue diluido en solución de bloqueo con PBS + 0,2% Tween 20 y se dejó durante 1 hora 30 minutos a temperatura ambiente. Tras incubar con el anticuerpo secundario, las secciones fueron nuevamente lavadas con PBST.

Anticuerpo	Antibody Registry ID	Hospedador	Dilución	Casa Comercial
Arginasa 1	AB_2227469	Cabra	1:200	Santa Cruz
CD16/CD32	AB_394656	Rata	1:400	BD Pharmingen
ColIV	AB_305584	Conejo	1:200	Abcam
Fibronectina	AB_447655	Conejo	1:200	Abcam
GFAP	AB_10013382	Conejo	1:2000	Dako
GFAP	AB_477035	Ratón	1:200	Dako
Iba1	AB_839504	Conejo	1:2000	Wako
Iba1	AB_2493179	Cobaya	1:500	Synaptics Systems
Neuronal Nuclei (NeuN)	AB_11210778	Ratón	1:500	Millipore
Neurocán	AB_2149716	Oveja	1:100	R&D Systems
PDGF-B	AB_10859010	Conejo	1:100	Bioss

Tabla 7: Anticuerpos primarios utilizados en la expresión de proteínas mediante la técnica inmunohistoquímica. De izquierda a derecha se detalla el nombre del anticuerpo, la identificación en la base de datos del Antibody Registry, el animal hospedador del cual se obtuvo el anticuerpo, la dilución utilizada en la técnica y la casa comercial donde se adquirieron los anticuerpos.

Anticuerpo	Antibody Registry ID	Hospedador	Dilución	Casa Comercial
α- IgG de ratón conjugada con biotina SP	AB_2338572	Cabra	1:2000	Jackson Immunoresearch
α- IgG de conejo conjugada con biotina SP	AB_2336930	Cabra	1:500	Jackson Immunoresearch
α- IgG de rata conjugada con biotina SP	AB_2338172	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
α- IgG de cabra conjugada con biotina SP	AB_2340396	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
α- IgG de oveja conjugada con biotina SP	AB_2340716	Burro	1:500	Jackson Immunoresearch
α- IgG de ratón conjugada con Alexa Fluor[®] 488	AB_141367	Cabra	1:1000	Invitrogen
α- IgG de conejo conjugada con Alexa Fluor[®] 594	AB_10562717	Cabra	1:1000	Life technologies
α- IgG de cobaya conjugada con Alexa Fluor[®] 488	AB_10562573	Cabra	1:500	Life technologies
Estreptavidina conjugada con Cy3	AB_2337244	-	1:1000	Jackson Immunoresearch

Tabla 8: Anticuerpos secundarios conjugados a biotina o a fluorescencia Alexa Fluor[®] utilizados en la detección de proteínas mediante inmunohistoquímica. De izquierda a derecha se detalla el nombre del anticuerpo, la identificación en la base de datos del Antibody Registry, el animal hospedador del anticuerpo, la dilución utilizada y la casa comercial donde se compraron los anticuerpos.

En el caso de la inmunohistoquímica simple realizamos una incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con el complejo de amplificación de señal avidina-biotina-peroxidasa Vectastain Elite ABC. Tras sucesivos lavados con PBS, la señal fue visualizada mediante una reacción de inmunoprecipitación de DAB (0,03% 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloreuro con 0,01% H₂O₂ en tampón fosfato 0,1 M) y, tras lavar bien los portaobjetos con tampón fosfato 0,1 M, se utilizó DePeX como solución de montaje. En algunos casos y, debido a la escasa intensidad de la señal, hubo que amplificar la señal con el kit de amplificación de tiramida TSA[™] Biotin System antes del revelado con DAB, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las secciones destinadas a inmunofluorescencia fueron marcadas con Hoechst 33342 (dilución 1:5000) para poder detectar los núcleos celulares, y montadas con la solución Fluoromount-G.

2.7.4. Tinción de Nissl para cuerpos neuronales

La tinción de Nissl marca el citoplasma de las neuronas y es una de las técnicas utilizadas para determinar la supervivencia neuronal. Utilizamos secciones de corteza cerebral de animales lesionados y tratados diariamente durante los 3 días posteriores a la operación, siendo a continuación sacrificados (tratamiento agudo, muerte a los 3 días). Estas secciones fueron hidratadas mediante concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 70, 50 y H₂O_d) durante 30 segundos, y teñidas a continuación con una disolución al 1% del colorante violeta de cresilo en H₂O_d durante 2 minutos. Una vez teñido, el tejido fue deshidratado con concentraciones crecientes de etanol (H₂O_d, 50, 70, 96, 100, 100) y Xilol. Como solución de montaje utilizamos DePeX.

2.7.5. Inmunocitoquímica

En el método de tinción inmunocitoquímica utilizamos células previamente fijadas y conservadas en PBS-Azida 0,1%. Inicialmente, las células fueron lavadas varias veces con PBS 1x para eliminar la azida. A continuación, el marcaje por uniones inespecíficas fue reducido, incubando las muestras con solución de bloqueo compuesta de 2% suero de cabra, 0,2% Tritón en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, y tras varios lavados con PBS, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario β III Tubulina (dilución 1:500) diluido en 2% BSA en PBS, durante toda la noche, a 4°C. Al día siguiente, tras varios lavados con PBS, las células fueron incubadas durante 1 hora y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario α - IgG de ratón conjugada a Alexa Fluor[®] 488 (dilución 1:1000), diluido en PBS. Tras varios lavados con PBS, las células finalmente fueron marcadas con Hoechst 33342, para la detección de sus núcleos.

2.7.6. Controles de especificidad del anticuerpo secundario

Tanto en la inmunohistoquímica como en la inmunocitoquímica realizamos controles de especificidad de marcaje, consistentes en la incubación de las muestras solamente con el anticuerpo secundario correspondiente a cada caso.

En todos los casos, se comprobó que el marcaje celular obtenido no estaba presente en el control de secundario realizado, por lo que correspondía al epítipo estudiado en cada momento.

2.7.7. Obtención y procesamiento de imágenes

Las fotografías de las secciones fueron obtenidas con un microscopio Olympus AX70 acoplado a un sistema de captura de imagen Olympus DP70.

En el caso de las secciones para inmunofluorescencia utilizamos un sistema confocal Leica TCS-SP, acoplado a un microscopio Leica DMI6000CS.

Por último, las células teñidas mediante la técnica de inmunocitoquímica fueron visualizadas y fotografiadas gracias a un microscopio con cámara acoplada Leica DFC 250FX.

Una vez obtenidas, las imágenes fueron procesadas mediante los softwares Cella, LAS AF Lite y Adobe Photoshop CS5.

2.7.8. Cuantificación y análisis de imagen

Con el fin de evaluar la inmunorreactividad en el córtex cerebral murino para cada uno de los anticuerpos utilizados en la técnica de la inmunohistoquímica simple (arginasa 1, CD16/CD32, colIV, fibronectina, GFAP, Iba1, IgG, neurocán, PDGF-B) se determinaron dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo que dista 100 μm y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm (Schachtrup et al., 2010) (Figura 9). Para cuantificar la expresión relativa de los marcadores utilizamos el programa ImageJ (ImageJ 1.48s; (Rasband, 2011)) y se obtuvo el valor del porcentaje de área marcada relativizada a las micras cuadradas de área analizada. El área marcada fue la media del área analizada en 5 - 6 secciones por animal.

En el caso de la tinción de Nissl, utilizamos la misma área delimitada a ambos lados de la lesión que en el caso de la inmunorreactividad. La supervivencia neuronal a través del marcaje de NeuN fue contabilizada con el número de neuronas presentes en la zona de cerebro cercana a la lesión fotografiada.

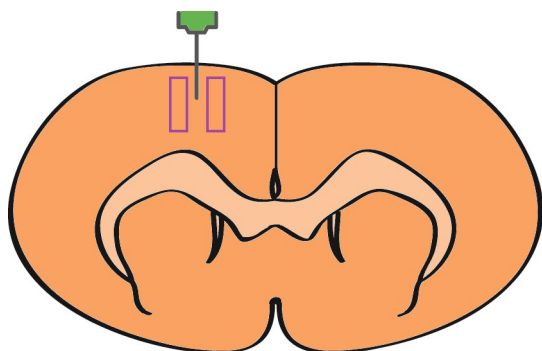


Figura 9: Dibujo esquemático del área delimitada para la evaluación de la inmunoreactividad. Se determinaron dos áreas a ambos lados de la lesión, acotadas por un rectángulo distante 100 μm de la lesión y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm .

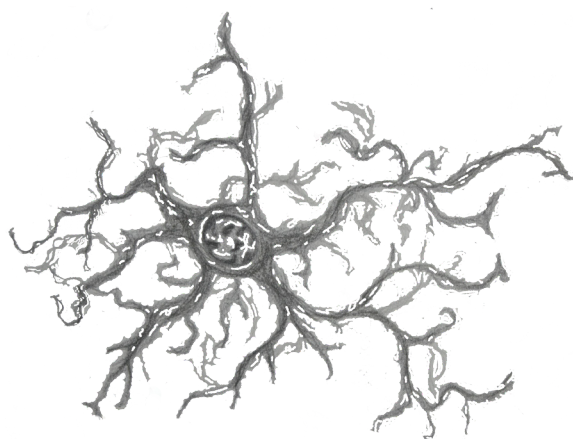
2.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete estadístico GraphPad Prism software versión 5.0 para Windows. Su representación viene dada como la media aritmética \pm el error estándar de la media (SEM).

Para determinar la homogeneidad de las varianzas, aplicamos el test ANOVA de una sola vía. Para los ensayos que no seguían una distribución Gaussiana, se utilizó el test ANOVA de Kruskal-Wallis. A continuación se realizó un test post-hoc de Dunns para determinar las diferencias en las varianzas entre los pares de tratamientos.

En función de la distribución muestral, se realizaron diferentes tests estadísticos para determinar las diferencias de las medias entre dos grupos. Cuando existía homocedasticidad y los dos grupos tenían el mismo número de observaciones, realizamos un t-test de Student pareado simple. Cuando existía homocedasticidad pero los dos grupos tenían diferente número de observaciones, realizamos un t-test de Student no pareado. En el caso de que la distribución muestral no se ajustase a una Gaussiana y las muestras fuesen pareadas, aplicamos el test no paramétrico de Wilcoxon, mientras que en el caso de que la distribución muestral no se ajustase a una Gaussiana y el número de observaciones entre los dos grupos fuese diferente, realizamos un test U de Mann-Whitney. Por último, en caso de heterocedasticidad, aplicamos un t-test de Student con la corrección de Welch's.

Los valores de p inferiores a 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos, considerando diferencias significativas (*) cuando $p < 0,05$, muy significativas (**) cuando $p < 0,01$, y altamente significativas (***) cuando $p < 0,001$.



Resultados

Resultados

1. **Análisis del efecto del Salubrinal sobre la transcripción génica, expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas de ECM inducidos por factores de crecimiento en cultivos de astrocitos**

Tras una lesión mecánica en el SNC, las células formadoras de la cicatriz segregan en la zona lesionada una serie de sustancias inhibitoras de la regeneración axonal que impiden la recuperación tras el daño. Esa respuesta celular consiste en un incremento de la síntesis de CSPGs y otras proteínas de ECM, principalmente producidas por astrocitos (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008). En el parénquima lesionado aumenta la expresión y liberación de factores de crecimiento, como EGF o TGF β 2, que promueven la secreción de proteoglicanos por parte de los astrocitos, induciendo la formación de la cicatriz (Makower et al., 1988; Lagord et al., 2002; Hamel et al., 2005; Gris et al., 2007; Schachtrup et al., 2010). Por ello, en la primera aproximación de nuestro estudio utilizamos cultivos de astrocitos procedentes de cortezas cerebrales murinas estimuladas con TGF β o EGF.

Por otro lado, el Salubrinal es capaz de modular la síntesis de proteínas secretadas en el RE, al mantener eIF2 α en su estado fosforilado. Sería, por tanto, un buen inhibidor de la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas (Boyce et al., 2005). Así, además de su efecto neuroprotector (Zhu et al., 2008; Lewerenz and Maher, 2009; Nakka et al., 2010), el Salubrinal inhibiría o modularía la formación de la cicatriz glial. Por ello, inicialmente nos propusimos evaluar el efecto del Salubrinal en modelos *in vitro*, antes de estudiar su efecto en un modelo animal.

1.1. **Efecto del Salubrinal sobre la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos**

Los cultivos de astrocitos corticales de ratón fueron tratados primero con 5 o 10 μ M de Sal003 durante 1 hora y luego con 10 ng/ml de TGF β o EGF durante 24 (para el estudio de la expresión proteica total) o 72 horas (para analizar la secreción).

Tras 24 horas de tratamiento, evaluamos la expresión del proteoglicano brevicán, de la proteína profibrótica CTGF y el nivel de glicosilación de los proteoglicanos con el anticuerpo frente a CS56 en los lisados de los astrocitos mediante western blot. El tratamiento con Sal003 causó una disminución en la expresión de brevicán (Figura 10 A y B), CS56 (Figura 10 A y C) y CTGF (Figura 10 A y D), previamente inducida por EGF o TGF β . Como control positivo del tratamiento con Sal003 utilizamos el nivel de fosforilación de eIF2 α (eIF2 α -P) (Figura 10 A y E). Todos los niveles de expresión se mostraron en relación a la expresión de la proteína α -Tubulina, que mostró una expresión similar en todos los tratamientos (Figura 10 A).

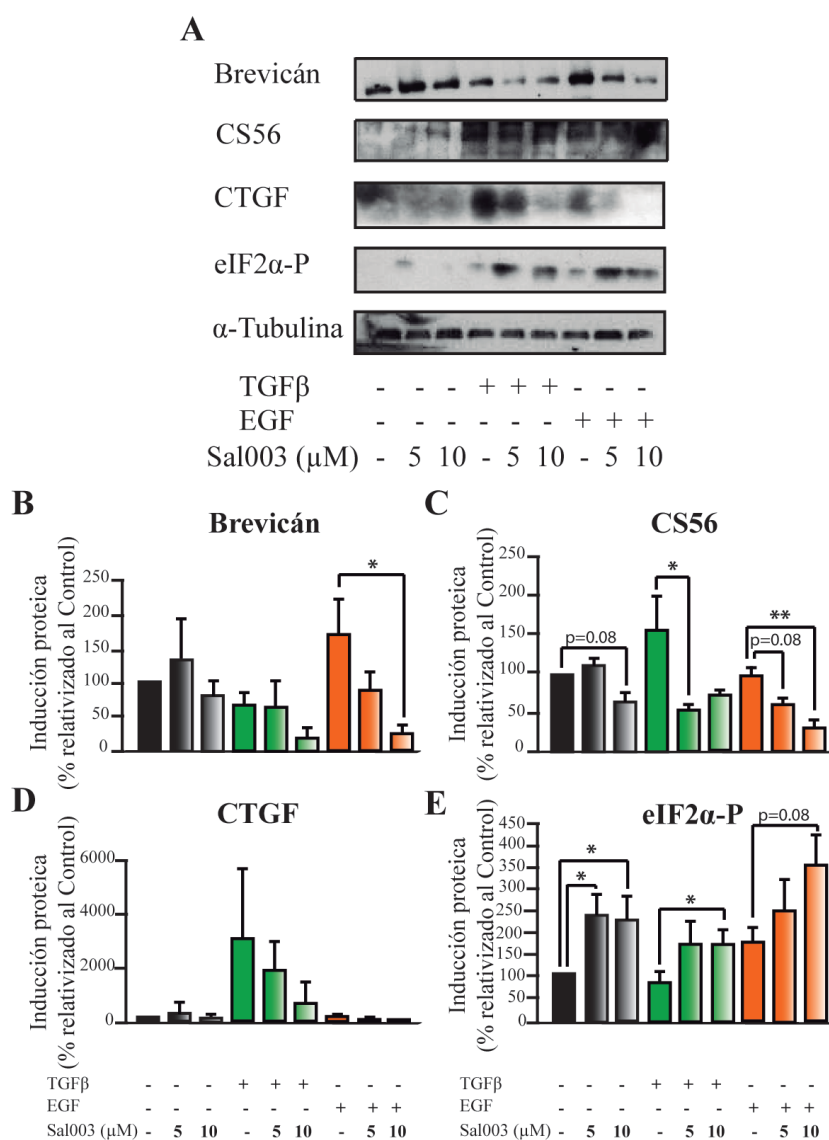


Figura 10: El Salubrinal reduce la expresión de proteoglicanos y proteínas profibróticas inducidas en astrocitos por TGFβ o EGF. El Salubrinal redujo la expresión de brevicán (A y B), CS56 (A y C) y CTGF (A y D) en lisados de astrocitos tratados con TGFβ o EGF durante 24 horas. Como control positivo del efecto del Sal003 utilizamos el nivel de fosforilación de eIF2α (eIF2α-P) (A y E). Utilizamos la expresión de α-Tubulina como control de carga (A). Los resultados representan la media ± SEM del porcentaje de inducción relativizado al control de, al menos, tres experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para estudiar mediante western blot el efecto del Salubrinal sobre la secreción de CS-PGs y CTGF, utilizamos los medios condicionados de cultivos de astrocitos tratados durante 72 horas. El tratamiento con Sal003 redujo la secreción de brevicán tras la estimulación con EGF, comparado con los astrocitos tratados sólo con el factor de crecimiento (Figura 11 A y B). Además, el Salubrinal disminuyó la secreción de CTGF inducida por TGFβ (Figura 11 A y C).

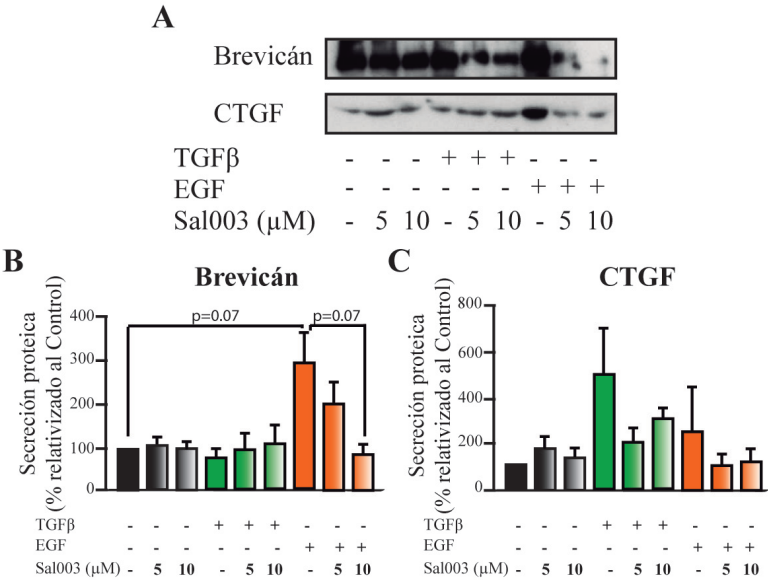


Figura 11: El Salubrinal reduce la secreción de brevicán y CTGF inducida en astrocitos por TGFβ o EGF. El Sal003 redujo la secreción de brevicán (A y B) y CTGF (A y C) en medio condicionado de cultivos de astrocitos tratados con EGF o TGFβ durante 72 horas. Los resultados representan la media ± SEM del porcentaje de secreción relativizado al control de, al menos, tres experimentos.

Estos resultados muestran que el Salubrinal reduce la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas inducidas en astrocitos por TGFβ o EGF.

Para comprobar que la inhibición en la expresión y secreción de los proteoglicanos y de la proteína CTGF por parte del Salubrinal no era debida a una reducción en la viabilidad o en el metabolismo en los astrocitos, realizamos un ensayo de incorporación de MTT a 24 y 72 horas, en las mismas condiciones de tratamiento que en el caso de los experimentos de western blot. Los resultados mostraron que los astrocitos tratados con los factores de crecimiento TGFβ o EGF y/o con Sal003 produjeron niveles de MTT similares a los astrocitos control, incubados sólo en medio de cultivo. Tanto a 24 (Figura 12 A) como a 72 horas (Figura 12 B) no observamos diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que el Salubrinal no afecta a la viabilidad celular de los astrocitos.

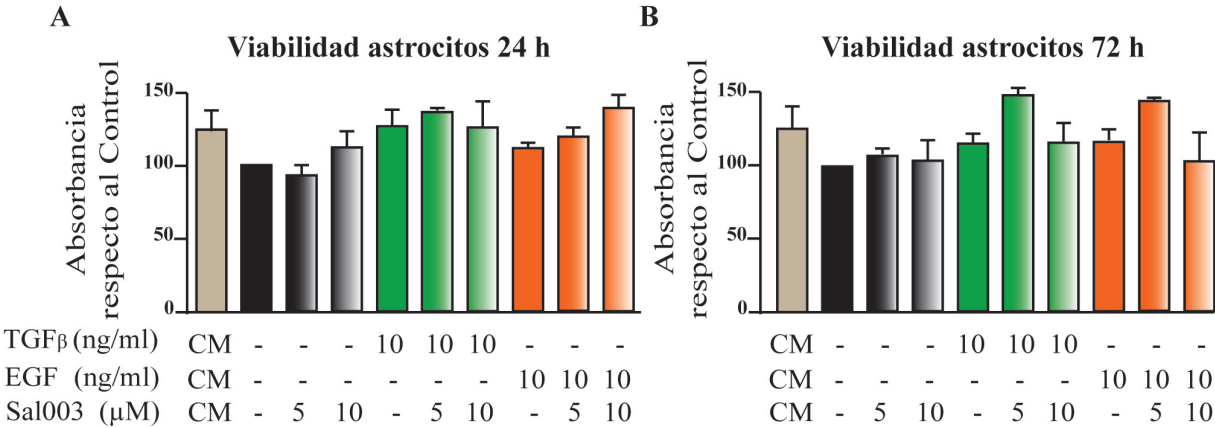


Figura 12 (página anterior): El Salubrinal no afecta a la viabilidad de los astrocitos. El tratamiento con Sal003, TGF β y EGF durante 24 (A) y 72 horas (B) no causó ningún efecto en la viabilidad astrocitaria. Tampoco hubo diferencias significativas de los tratamientos con respecto a los astrocitos tratados con el medio control (CM) compuesto de DMEM completo. Los resultados representan la media \pm SEM del porcentaje de la viabilidad celular relativizada al control de tres experimentos, cada uno de ellos hecho por triplicado.

Por último y, para comprobar que el efecto del Salubrinal sobre la expresión y secreción de CSPGs y proteínas profibróticas no era debido a un efecto sobre la ruta del TGF β , llevamos a cabo un ensayo de transfección génica con el plásmido reportero CAGA-luc que presenta sitios de unión a los factores de transcripción Smad2/3. Para ello, una vez transfectadas las células, se pretrataron con Sal003 y, a continuación, con TGF β . Tras 24 horas de tratamiento, observamos que, mientras que el tratamiento con TGF β indujo la expresión de CAGA con respecto al control, el tratamiento con Sal003 no modificó la medida con respecto a los astrocitos tratados sólo con TGF β (Figura 13). Por ello, el Salubrinal no afecta a la ruta transcripcional de Smad2/3 activada por TGF β en cultivos de astrocitos.

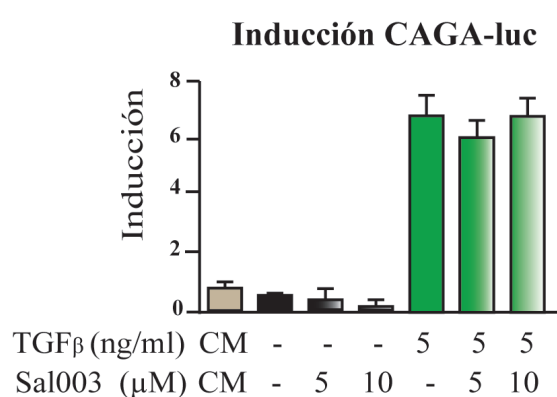


Figura 13: El Salubrinal no afecta a la activación transcripcional de la ruta del TGF β en cultivos de astrocitos. El tratamiento con Sal003 no ejerció ningún efecto sobre cultivos de astrocitos transfectados con el plásmido CAGA-luc, previamente inducidos con el tratamiento con TGF β durante 24 horas. Los resultados representan la media \pm SEM de la inducción de tres experimentos, cada uno de ellos hecho por triplicado.

1.2. Efecto del Salubrinal sobre la expresión de ARNm para proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos

Tras comprobar que el Salubrinal reduce la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas, estudiamos si el efecto se restringía a las proteínas, o también afectaba a la expresión del ARNm. Para ello, pretratamos cultivos de astrocitos con Sal003 y luego con los factores de crecimiento TGF β y EGF y, a continuación, determinamos la expresión de ARNm para diferentes proteoglicanos y proteínas profibróticas mediante la técnica de qPCR.

Tras de 24 horas de tratamiento evaluamos la expresión de ARNm para los proteoglicanos neurocán, brevicán y fosfacán, de la proteína profibrótica CTGF, para la enzima XylT-I y para factor de polimerización CPF, ambos esenciales en la ruta de síntesis de los CSPGs. Como control endógeno para relativizar la expresión transcripcional de todos los genes estudiados utilizamos la expresión del gen RPS29. En cultivos de astrocitos, el tratamiento con Sal003 redujo la expresión de neurocán (Figura 14 A), brevicán (Figura 14 B), fosfacán (Figura 14 C), CTGF (Figura 14 D), de la enzima XylT-I (Figura 14 E) y del factor de polimerización CPF (Figura 14 F), previamente inducida por TGFβ o EGF. Como control positivo del efecto del Salubrinal, medimos la expresión de ARNm para la enzima asparagina sintetasa (Figura 14 G).

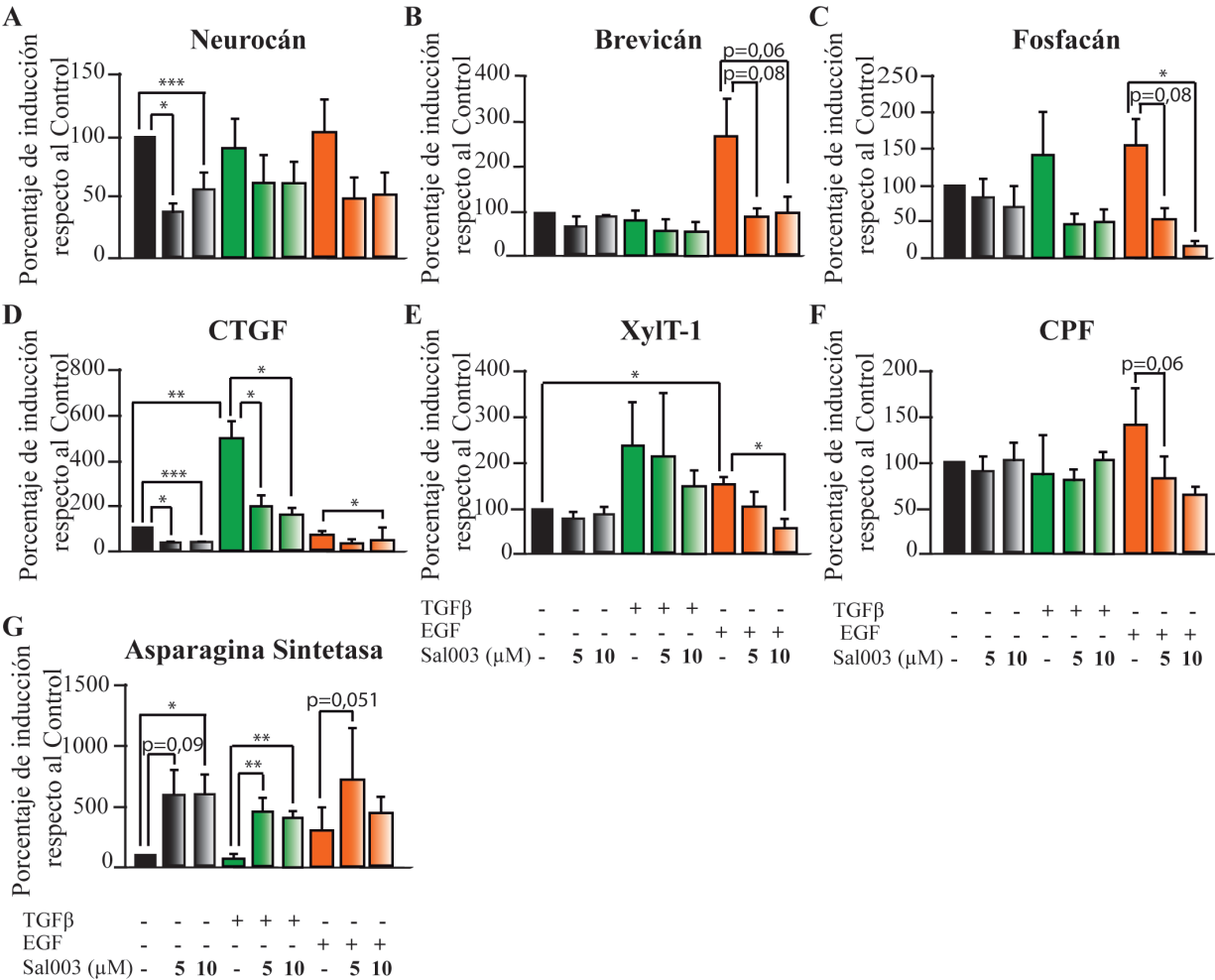


Figura 14: El Salubrinal disminuye la expresión de ARNm para los proteoglicanos y proteínas profibróticas inducidas por TGFβ o EGF en astrocitos. La expresión de ARNm de diferentes proteoglicanos y proteínas profibróticas se determinó mediante la técnica de qPCR. El Salubrinal redujo la expresión de neurocán (A), brevicán (B), fosfacán (C), CTGF (D), de la enzima XylT-1 (E) y del factor de polimerización CPF (F) en cultivos de astrocitos tratados con TGFβ o EGF durante 24 horas. Como control positivo de la acción

del Sal003 utilizamos la expresión de ARNm para la enzima asparagina sintetasa (G). Como control endógeno para relativizar la expresión de todos los genes utilizamos la expresión de ARNm para el gen RPS29. Los resultados representan la media del porcentaje de la inducción relativizada al control en la expresión de ARNm para cada uno de los genes / la expresión de ARNm para RPS29 \pm SEM de, al menos, cuatro experimentos, cada uno de ellos hecho en triplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Estos resultados demuestran, por primera vez, que el efecto del Salubrinal sobre la expresión de proteoglicanos y proteínas profibróticas no sólo se produce a nivel traduccional, sino también a nivel transcripcional.

2. Evaluación del efecto del Salubrinal en un modelo *in vitro* de cicatriz glial y sus posibles efectos sobre el crecimiento neurítico

A continuación, evaluamos el efecto del Salubrinal en un modelo *in vitro* de cicatriz glial. Para ello, realizamos un cocultivo de fibroblastos y astrocitos que se trató con Sal003 y TGFβ, y tras el tratamiento, plaqueamos sobre ellos neuronas corticales. A continuación, determinamos el efecto de los diferentes tratamientos sobre el crecimiento neurítico.

En primer lugar comprobamos que ni el Salubrinal ni el TGFβ tenían efecto sobre la viabilidad o el metabolismo celular de los fibroblastos y las neuronas corticales. Para ello realizamos un ensayo de incorporación de MTT a 48 horas, tiempo que se empleó después en el modelo *in vitro* de cicatriz glial. Los resultados mostraron que los fibroblastos tratados con Sal003 mantienen similares los niveles de MTT con respecto al Control (Figura 15 A). Así mismo, a las 48 horas no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados a las neuronas (Figura 15 B), por lo que ni el Sal003 ni el TGFβ afectan a la viabilidad neuronal.

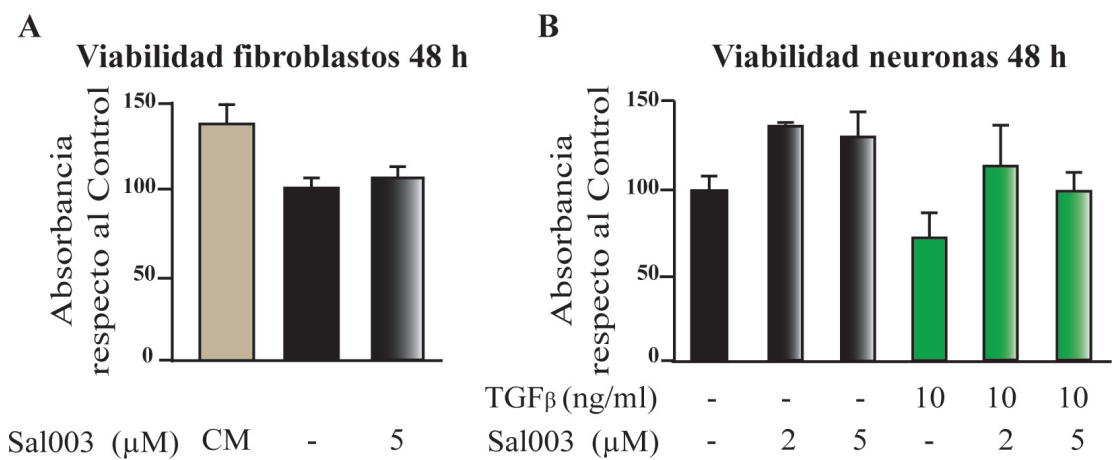


Figura 15: El Salubrinal no afecta ni a la viabilidad de los fibroblastos y las neuronas. El tratamiento con Sal003 durante 48 horas no causó ningún cambio en la viabilidad de los fibroblastos. Tampoco hubo diferencias significativas de los tratamientos con respecto a los fibroblastos tratados con el medio control (CM) compuesto de DMEM completo (A). Asimismo, el tratamiento con Sal003 y TGFβ durante 48 horas no ejerció ningún efecto en la viabilidad neuronal (B). Los resultados representan la media ± SEM del porcentaje de la viabilidad celular con relación al control de, al menos, cuatro experimentos, cada uno de ellos hecho por triplicado.

Tras esta comprobación, estudiamos el efecto del Salubrinal sobre el crecimiento neurítico en el modelo *in vitro* de cicatriz glial, descrito anteriormente por Kimura-Kuroda

y colaboradores (Kimura-Kuroda et al., 2010). El cocultivo de astrocitos y fibroblastos se preincubó con Sal003 o vehículo y, tras 1 hora de incubación, se estimularon con TGF β . Tras 72 horas de tratamiento, cambiamos el medio y sembramos encima del cocultivo neuronas corticales, durante 48 horas. Tras este tiempo, determinamos el crecimiento neurítico mediante un estudio estereológico del mismo (Figura 16 A). El análisis estereológico (Figura 16 B) nos permitió observar que el tratamiento con TGF β redujo el crecimiento neurítico en el cocultivo (Figura 16 A d, g y B) y que el Sal003 revirtió dicha inhibición, incrementando el crecimiento neurítico más allá de los valores control (Figura 16 A b, c, e, f, h, i y B).

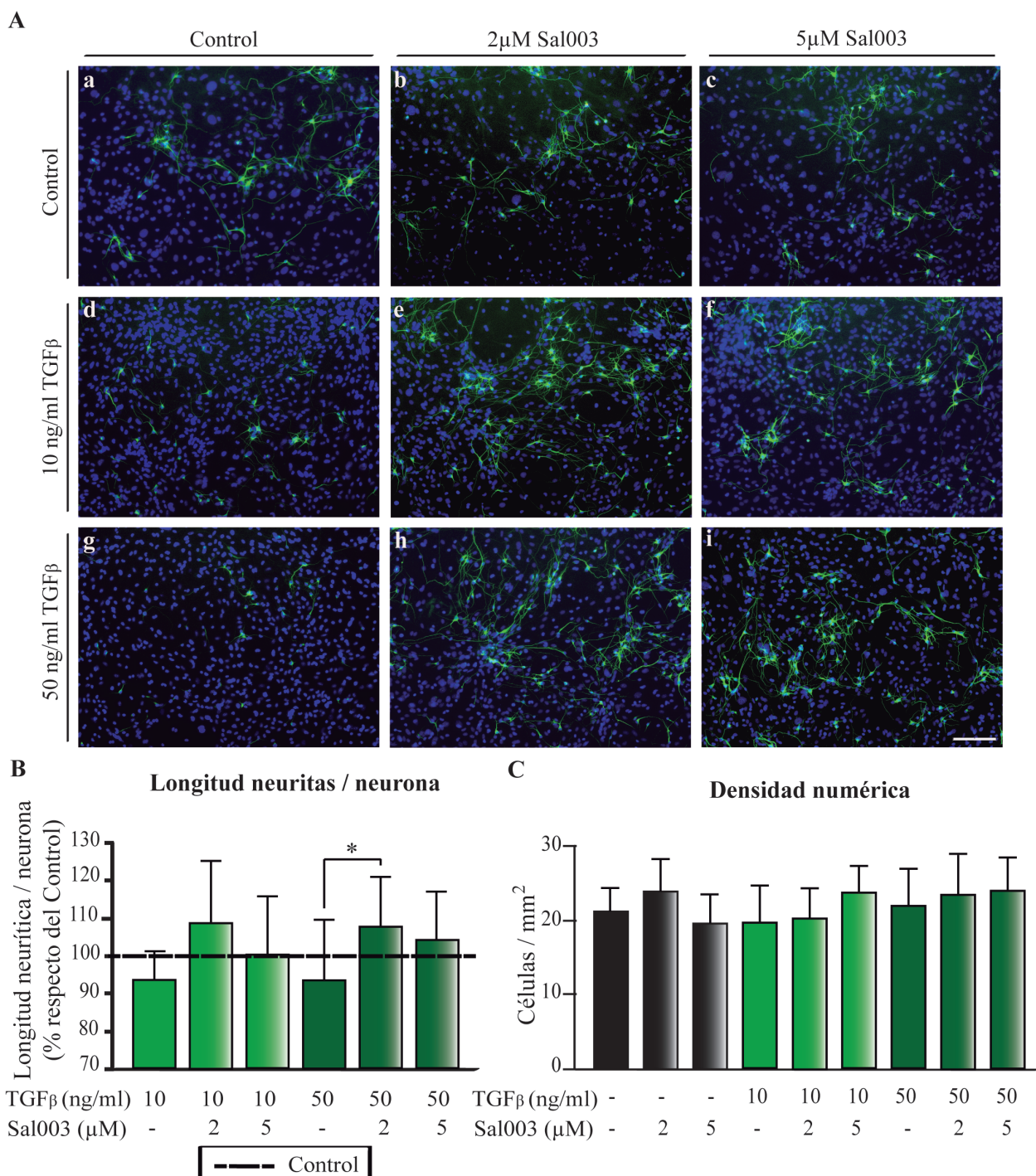


Figura 16 (página anterior): El Salubrinal incrementa el crecimiento neurítico en un modelo *in vitro* de cicatriz glial. El crecimiento neurítico (A) fue determinado en células control (a), control con 2 μ M de Sal003 (b), control con 5 μ M de Sal003 (c), tratadas con 10 ng/ml de TGF β (d), 10 ng/ml de TGF β y 2 μ M de Sal003 (e), 10 ng/ml de TGF β y 5 μ M Sal003 (f), 50 ng/ml de TGF β (g), 50 ng/ml de TGF β y 2 μ M de Sal003 (h), y 50 ng/ml de TGF β y 5 μ M Sal003 (i) durante 48 horas. La cuantificación del análisis estereológico se muestra en el gráfico B. El tratamiento con TGF β (d, g y B) redujo el crecimiento neurítico en un cocultivo de astrocitos y fibroblastos. El Sal003 revirtió dicho efecto, incrementando incluso el crecimiento neurítico sobre el control (b, c, e, f, h, i y B). Por otra parte, ni el tratamiento con TGF β ni con Sal003 mostró diferencias significativas en el análisis estereológico del número de neuronas en el cocultivo (C). Los resultados representan la media \pm SEM de cuatro experimentos, cada uno de ellos hecho por duplicado. En el gráfico B el resultado se refiere a la media del porcentaje de la relación entre el crecimiento neurítico y el número total de neuronas con respecto al control \pm SEM. En el gráfico C el resultado se refieren a la media \pm SEM del número de células por mm². * $p < 0,05$. Barra de escala = 200 μ m.

Para demostrar que el incremento del crecimiento neurítico inducido por el Salubrinal no afectaba al número de neuronas en el modelo *in vitro* de cicatriz glial utilizado, realizamos un análisis estereológico, estimando la densidad numérica de las neuronas cultivadas. No observamos diferencias significativas con el tratamiento de TGF β ni con el de Sal003 (Figura 16 C), por lo que ninguno de los tratamientos afectaba a la densidad neuronal.

Estos resultados demuestran que el Salubrinal tiene un efecto beneficioso sobre el crecimiento neurítico de neuronas en un modelo *in vitro* de cicatriz glial.

3. Determinación del patrón de expresión celular y espacio-temporal de la reactividad glial tras una lesión mecánica en un modelo animal de cicatriz glial. Efecto del Salubrinal sobre la reactividad glial y modulación de la cicatriz formada tras la lesión

Puesto que el Salubrinal inhibe la expresión, secreción y expresión de ARNm para proteoglicanos y otras proteínas profibróticas, y presenta un efecto beneficioso en un modelo *in vitro* de cicatriz glial, podría tener un efecto modulador sobre la cicatriz glial *in vivo*. Para comprobarlo, estudiamos este posible efecto en un modelo de lesión lacerante de la corteza cerebral de ratones. Determinamos los tipos celulares presentes tras una lesión mecánica en el SNC, el patrón espacio-temporal de la reactividad celular, y el efecto del Salubrinal sobre ellos.

Para ello insertamos verticalmente una aguja en el hemisferio cerebral izquierdo de los ratones, lo que ocasiona una herida precisa, en la que posteriormente se desarrollará una cicatriz glial en la masa encefálica. Este modelo es sencillo y reproduce las condiciones necesarias para abordar un detallado estudio de la cicatriz glial inducida por una lesión en el SNC.

La administración de Salubrinal a los ratones se hizo mediante inyección intraperitoneal de una solución en PBS de 1 mg/kg de Sal003. Esta dosis ya había sido utilizada previamente en modelos animales similares (Zhu et al., 2008; Moreno et al., 2012; Yokota et al., 2013). No obstante, antes de realizar un estudio más exhaustivo, comprobamos que el peso de los animales a lo largo de 2 semanas postlesión no se afectaba por el tratamiento con Sal003 (Figura 17). Comprobamos que no había diferencias entre los cuatro grupos experimentales (Control, Control + Sal003, Lesión y Lesión + Sal003), por lo que el peso de todos los animales sigue una evolución similar a lo largo del tiempo en todos los grupos experimentales.

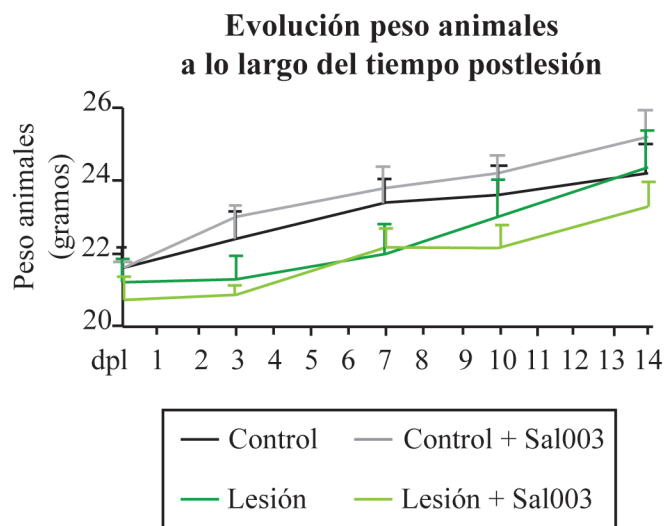


Figura 17: El Salubrinal no afecta al peso de los animales lesionados. Evaluamos el peso de ratones lesionados y tratados con Sal003 durante 3dpl los días 0, 3, 7, 10 y 14 dpl. El Salubrinal no afectó a la evolución temporal del peso de los animales. El experimento representa la media \pm SEM de, al menos, 5 animales por tratamiento (Control, n=5; Control + Sal003, n= 5, Lesión, n=7; Lesión + Sal003, n=7).

3.1. Efecto del Salubrinal sobre la supervivencia neuronal en un modelo *in vivo* de lesión

Inicialmente estudiamos el efecto del Salubrinal sobre la supervivencia neuronal, ya que está descrito su efecto neuroprotector. Para ello, utilizamos cortes de tejido procedente de animales lesionados, tratados con Salubrinal durante 3 dpl y sacrificados a continuación (tratamiento agudo, muerte a los 3 dpl), y en ellas realizamos dos aproximaciones histológicas.

En la primera de ellas, y como aproximación orientativa, teñimos las muestras con violeta de cresilo y determinamos el número de cuerpos de Nissl presentes tras la lesión (Figura 18 A). Esta técnica se utiliza frecuentemente en la literatura para determinar *grosso modo* la muerte neuronal (Gittins and Harrison, 2004). Los animales lesionados presentaban una reducción en el número de cuerpos de Nissl con respecto a los controles del 34% ($p=0,051$) (Figura 18 A y B). Sin embargo, el tratamiento con Sal003 incrementaba muy significativamente el número de cuerpos de Nissl con respecto a los animales lesionados, recuperando los niveles con respecto a los animales control ($p<0,01$) (Figura 18 A y B).

A continuación cuantificamos el número de neuronas presentes en la zona de lesión mediante el marcaje con el anticuerpo anti-NeuN, específico de células neuronales. Al igual que ocurría con la tinción de Nissl, los animales lesionados mostraban una reducción en el marcaje para NeuN con respecto a los animales control, siendo en este caso del 25%. El tratamiento con Sal003 aumentó significativamente el número de células marcadas con respecto a los animales lesionados ($p<0,05$), devolviéndolo a los niveles de marcaje de los animales control (Figura 18 C).

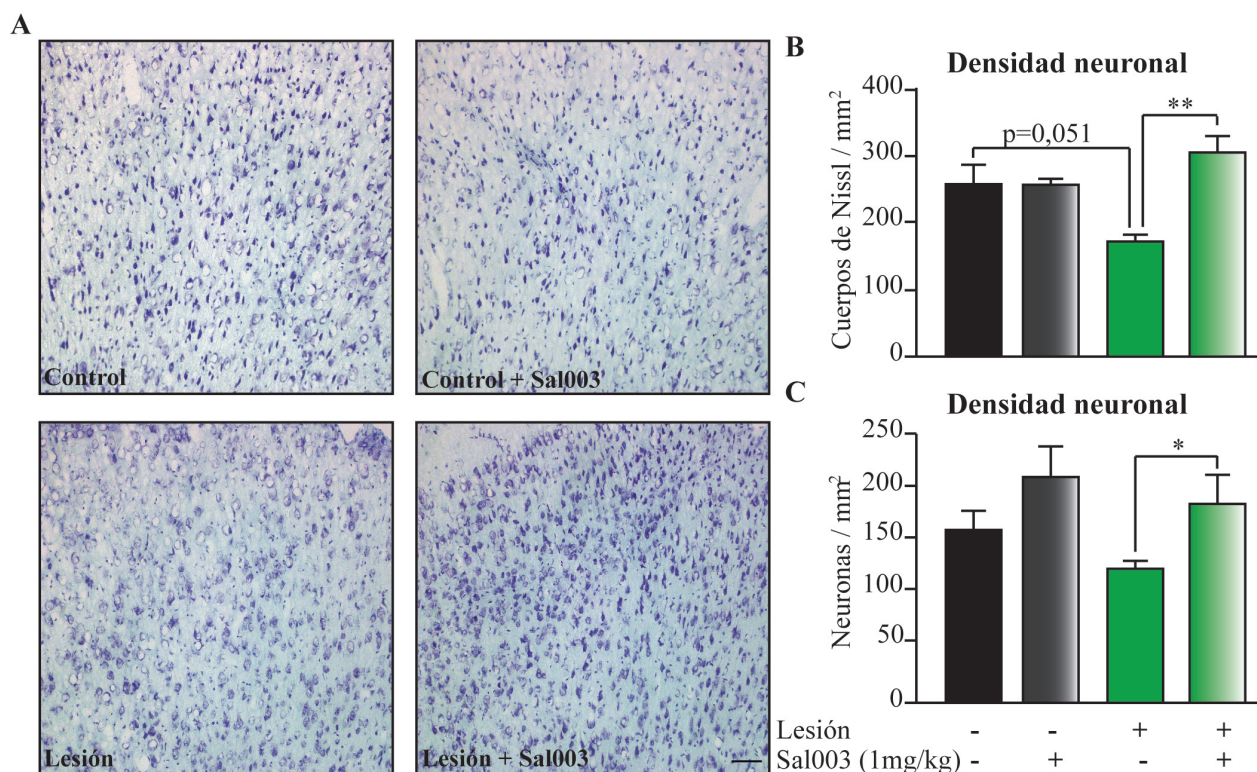


Figura 18: El Salubrinal favorece la supervivencia neuronal tras una lesión en la corteza cerebral. Cortes de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 3 dpl fueron teñidos con técnicas inmunohistoquímicas. Se llevaron a cabo 2 aproximaciones para determinar la supervivencia neuronal. En la primera estudiamos la densidad neuronal mediante la tinción con el colorante violeta de cresilo (A) y evaluamos el número de cuerpos de Nissl respecto al total de área analizada en mm² (B). El área analizada se determinó mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μ m del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μ m x 1000 μ m. En la segunda aproximación determinamos el número de neuronas marcadas con el anticuerpo anti-NeuN y cuantificamos el número de células marcadas / mm² del área total analizada (C). En ambos casos, la lesión redujo el número de neuronas presentes en la zona de lesión con respecto a los animales control. El tratamiento con Sal003 incrementó significativamente la supervivencia neuronal con respecto a los animales lesionados no tratados. Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, 5 animales por tratamiento (Control, n=5; Control + Sal003, n=5; Lesión, n=6; Lesión + Sal003, n=7). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra de escala = 100 μ m.

Estos resultados confirman que el tratamiento con Salubrinal tiene un efecto neuroprotector tras una lesión lacerante en la corteza cerebral de ratón.

3.2. Efecto del Salubrinal en un modelo *in vivo* de lesión con un tratamiento agudo y muerte a los 3 dpl

Los animales fueron lesionados y tratados diariamente durante los 3 días posteriores a la operación, siendo sacrificados a continuación (tratamiento agudo, muerte a los 3 días). Tras el procesamiento de las muestras, se evaluó el efecto del Salubrinal sobre la reactividad glial y sobre otros marcadores importantes en la formación de la cicatriz glial.

Ante una agresión externa o daño tisular, tanto los astrocitos como la microglía se movilizan hacia la zona afectada, contribuyendo a formar la cicatriz glial. Las células adquieren un fenotipo reactivo (característicamente fibroso para los astrocitos y ameboide para la microglía) y segregan una serie de moléculas para hacer frente al daño producido (Pekny and Nilsson, 2005; Hanisch and Kettenmann, 2007). Por ello, determinamos la reactividad glial en secciones coronales de tejido cerebral de los diferentes grupos experimentales, mediante la inmunoreactividad frente a GFAP (como marcador de astrocitos) y frente a Iba1 (como marcador de microglía) en secciones coronales de tejido cerebral de los diferentes grupos experimentales. En los animales lesionados, tanto los astrocitos como la microglía sufrieron un cambio morfológico al estado reactivo, aumentando su citoplasma y engrosando sus prolongaciones respecto a las células de animales control (Figura 19 A fotografías ampliadas). Además, los animales lesionados mostraron un aumento altamente significativo en la inmunorreactividad frente a GFAP e Iba1 con respecto a los animales sin lesionar ($p < 0,001$). El tratamiento agudo de los ratones lesionados con Sal003 no afectó a la expresión de GFAP, y por tanto a la reactividad astrocitaria (Figura 19 A d y B). Sin embargo, el Sal003 incrementó moderadamente la expresión de Iba1 con respecto a los animales lesionados no tratados, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 19 A h y C).

Tras evaluar los efectos en la reactividad glial, examinamos si la capacidad inhibidora de la expresión de proteoglicanos observada en experimentos realizados en cultivos de astrocitos, también era reproducible en el modelo de cicatriz glial *in vivo*. Sin embargo, el tratamiento agudo con Sal003 no afectó a la expresión de neurocán con respecto a los animales lesionados no tratados (Figura 20 A d y B). Por ello, el Salubrinal no es capaz de inhibir la expresión del proteoglicano neurocán en el modelo *in vivo* de cicatriz glial.

Otra de las moléculas importantes en la formación de la cicatriz es la fibronectina, expresada principalmente por los fibroblastos. Los niveles de fibronectina aumentaron significativamente en los animales lesionados con respecto a los controles ($p < 0,05$). Además, el tratamiento con Sal003 incrementó muy levemente la expresión de fibronectina con respecto a los animales lesionados, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 20 A h y C).

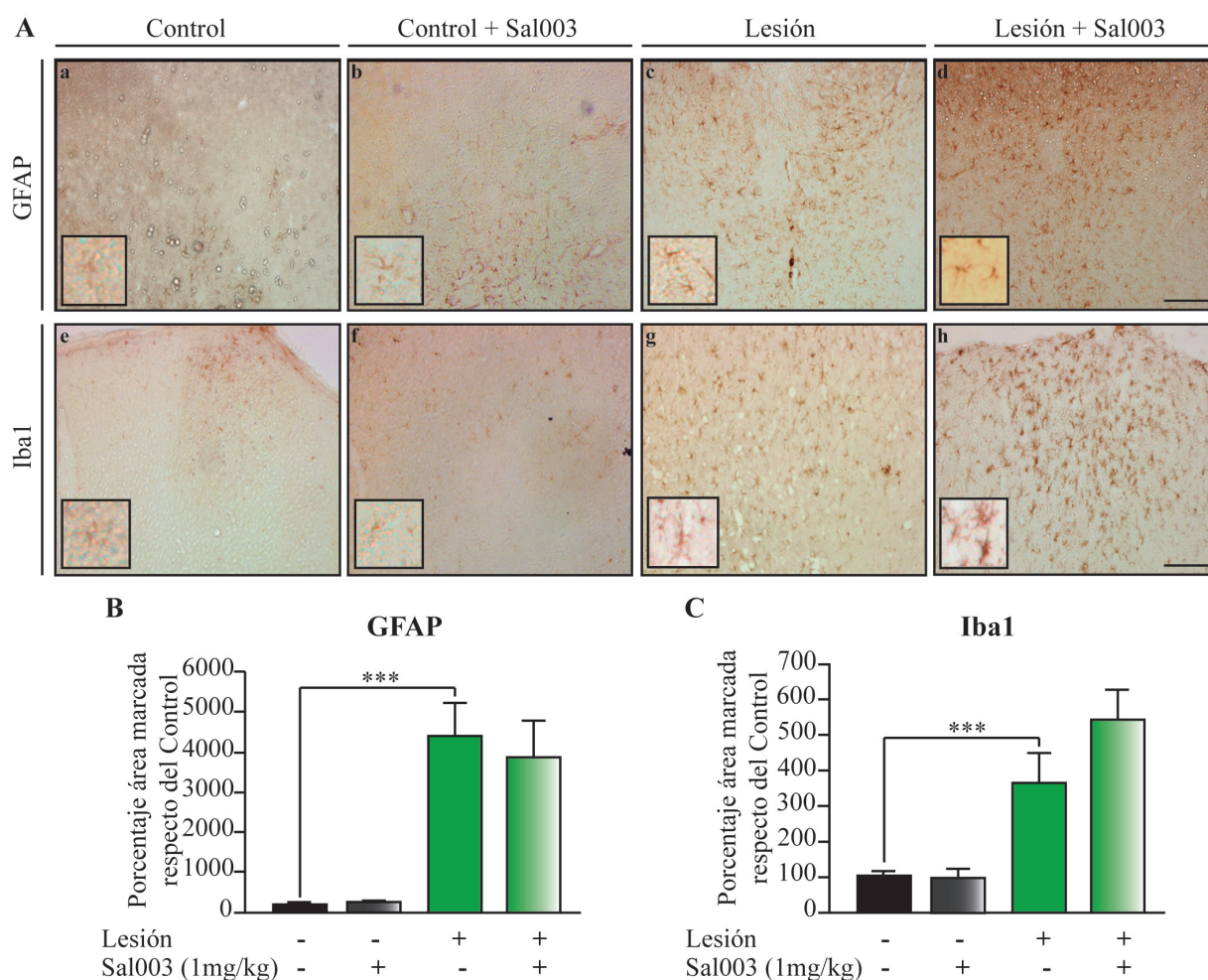


Figura 19: Efecto del Salubrinal sobre la inmunorreactividad astrogliar y microglial tras una lesión con un tratamiento agudo y sacrificio a los 3 dpl. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con cortes de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 3 dpl. Medimos la expresión de GFAP como marcador de reactividad astrocitaria e Iba1 como marcador de reactividad microglial (A), y determinamos el porcentaje de área marcada con respecto al control. El área analizada se determinó mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μm del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm . El tratamiento agudo con Sal003 no afectó a la expresión de GFAP en los animales lesionados (d y B). Sin embargo, el Sal003 aumentó discretamente la expresión de Iba1 con respecto a los animales lesionados no tratados (h y C). Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, seis animales por tratamiento (Control, n=6; Control + Sal003, n=8; Lesión, n=11; Lesión + Sal003, n=9). *** $p < 0,001$. Barra de escala = 100 μm .

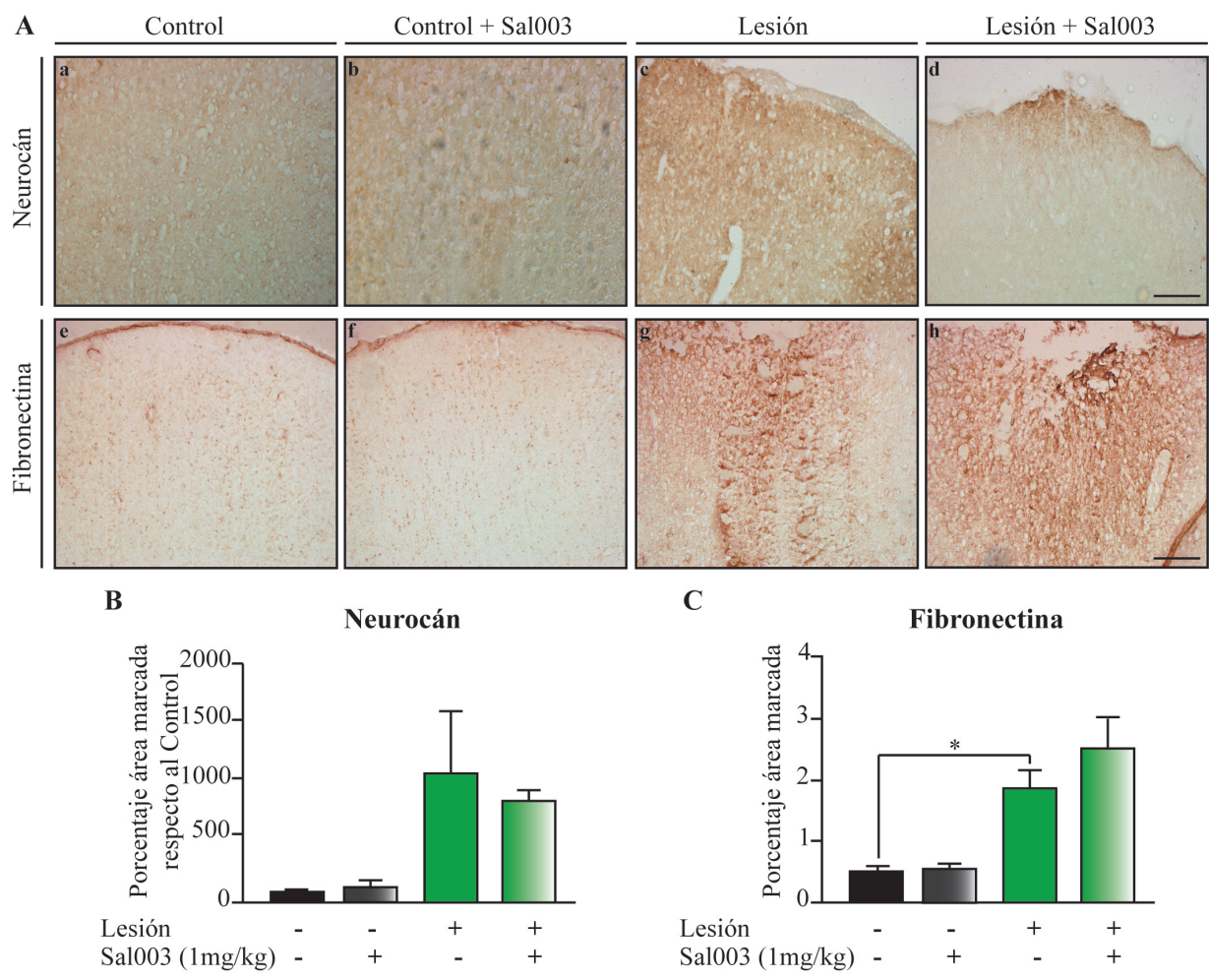


Figura 20: Efecto del Salubrinal en el marcaje de neurocán y fibronectina tras la lesión con un tratamiento agudo y sacrificio a los 3 dpl. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con secciones de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 3 dpl. Medimos la expresión del proteoglicano neurocán y de fibronectina (A), y determinamos el porcentaje de área marcada con respecto al control en el caso del neurocán, y el porcentaje del área marcada con respecto al total del área analizada en el caso de la fibronectina. El área analizada fue determinada mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μm del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm . El tratamiento agudo con Sal003 no afectó a la expresión de neurocán en los animales lesionados (d y B). Además, el Sal003 aumentó discretamente la expresión de fibronectina con respecto a los animales lesionados (h y C). Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, tres animales por tratamiento (Control, n=3; Control + Sal003, n=4; Lesión, n=4; Lesión + Sal003, n=4). * $p<0,05$. Barra de escala = 100 μm .

3.3. Efecto del Salubrinal en un modelo *in vivo* de lesión con un tratamiento agudo y muerte a los 21 dpl

Como ya expusimos en la *Introducción*, hasta que no han transcurrido aproximadamente 21 días tras producirse la lesión, la cicatriz no está completamente formada, cerrándose entonces la herida causada. Por ello, una vez estudiados los efectos del Salubrinal en fases tempranas posteriores a la lesión, evaluamos su efecto en un modelo *in vivo* en la fase de consolidación de la cicatriz con un tratamiento agudo con Salubrinal. Así, los animales fueron lesionados y tratados diariamente durante los 3 primeros días posteriores a la operación, siendo sacrificados a los 21 dpl (tratamiento agudo, muerte a los 21 días).

Evaluamos el efecto del Salubrinal sobre la reactividad astrocitaria y microglial y en la expresión de fibronectina, esenciales para la composición de la cicatriz. Al igual que la aproximación anterior, tanto la expresión de GFAP ($p<0,05$), como la de Iba1 ($p<0,05$), y la de fibronectina ($p<0,01$), aumentaron, significativamente y muy significativamente respectivamente, en los animales lesionados con respecto a los controles. El tratamiento con Sal003 no afectó a la expresión de GFAP en los animales lesionados (Figura 21 A d y B). Sin embargo, en los animales lesionados tratados con Sal003 disminuyó muy significativamente la expresión de Iba1 ($p<0,01$) (Figura 21 A h y C) y, por lo tanto, la reactividad microglial. El tratamiento con Sal003 de los animales lesionados aumentó muy significativamente la expresión de fibronectina con respecto a los animales lesionados no tratados ($p<0,01$) (Figura 21 A l y D).

Además, también estudiamos el efecto del Salubrinal sobre la expresión del proteoglicano neurocán y del colIV (marcador de células endoteliales) tras un tratamiento agudo y muerte a los 21dpl. El tratamiento con Sal003 no afectó a la expresión de ninguna de las dos moléculas, mostrando valores similares a la de los animales lesionados no tratados, tanto en el caso del neurocán (Figura 22 A d y B), como en el del colIV (Figura 22 A h y C).

En conclusión, el tratamiento con Salubrinal durante los 3 primeros días tras la lesión (tratamiento agudo) afecta a la población de microglía y a la expresión de fibronectina en la zona alrededor de la lesión.

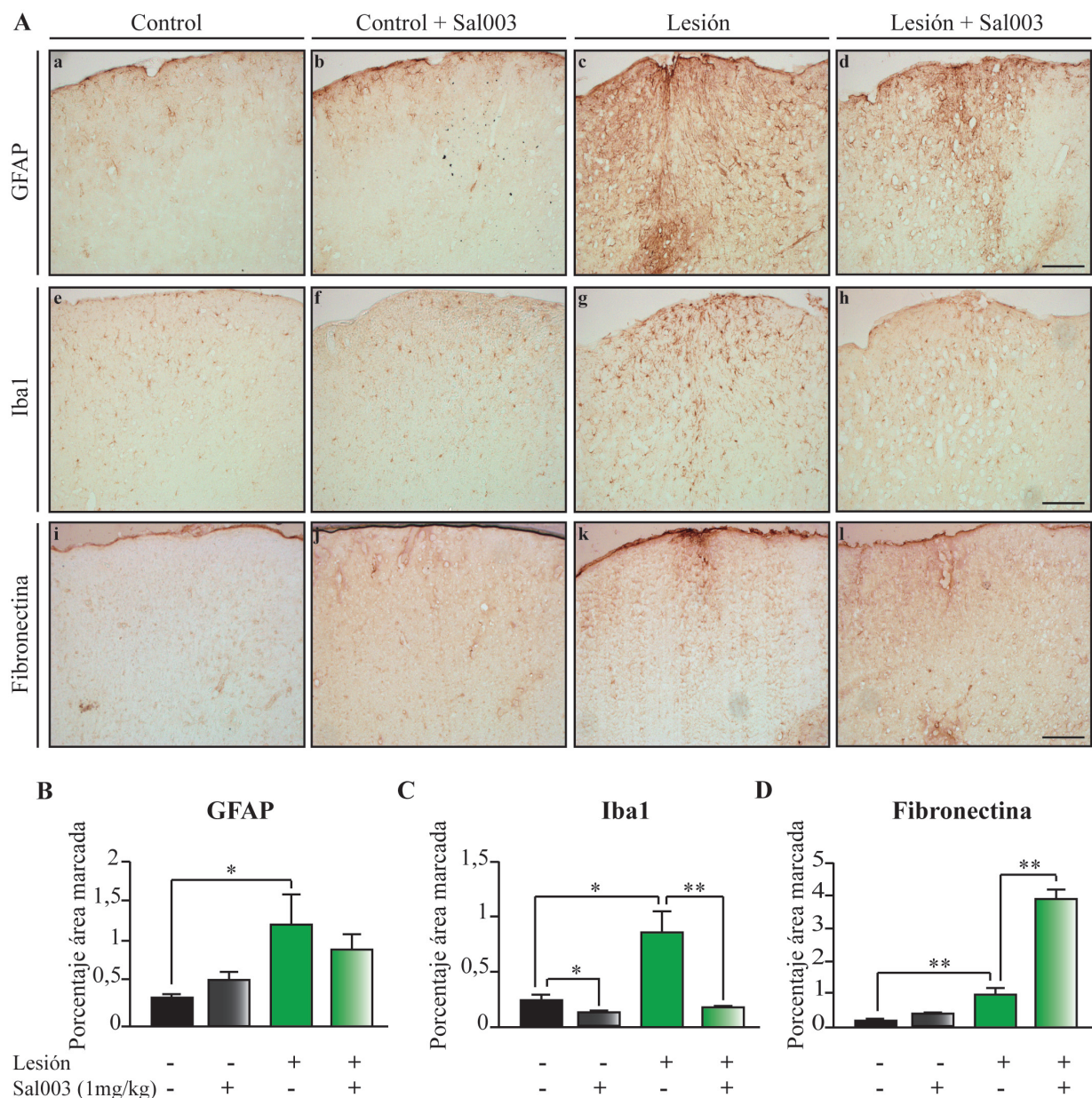


Figura 21: Efecto del Salubrinal sobre la inmunorreactividad astrogial y microglial y en la expresión de fibronectina tras la lesión con un tratamiento agudo y sacrificio a los 21 dpl. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con secciones de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 21 dpl. Medimos la expresión de GFAP (como marcador de astrocitos), de Iba1 (como marcador de microglía) y de fibronectina (A), y determinamos el porcentaje de área marcada con respecto al total de área analizada. El área analizada se determinó mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μm del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm . El tratamiento agudo con Sal003 no afectó a la expresión de GFAP en los animales lesionados (d y B). Sin embargo, el Sal003 causó una disminución muy significativa en la expresión de Iba1 con respecto a los animales lesionados no tratados (h y C), y aumentó muy significativamente la expresión de fibronectina con respecto a los animales lesionados no tratados (l y D). Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, cinco animales por tratamiento (Control, n=6; Control + Sal003, n=7; Lesión, n=5; Lesión + Sal003, n=5). * p<0,05, ** p<0,01. Barra de escala = 100 μm .

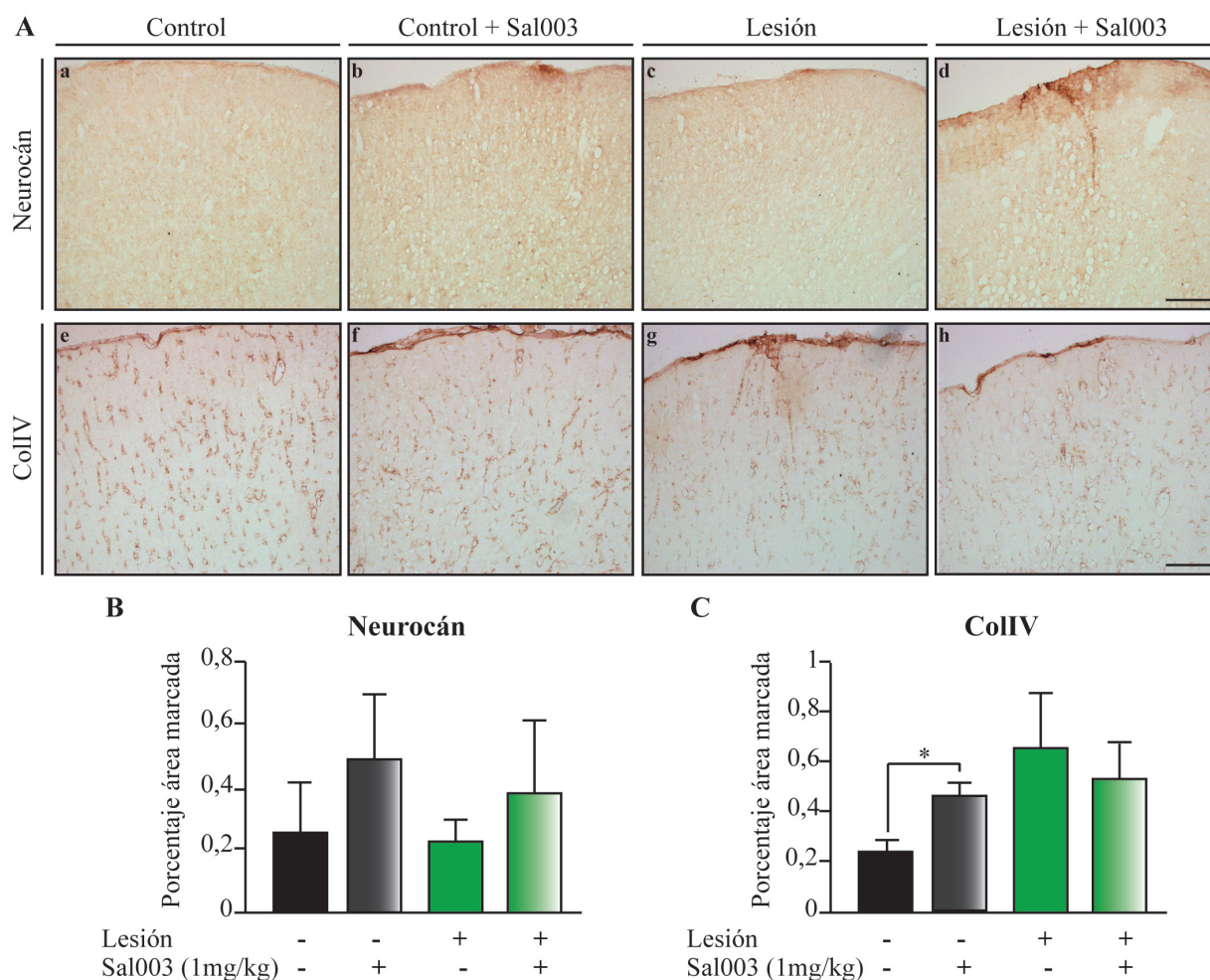


Figura 22: Efecto del Salubrinal sobre el marcaje de neurocán y colIV tras la lesión, seguida de un tratamiento agudo y sacrificio a los 21dpl. Los ratones fueron lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 21 dpl. Los cerebros fueron seccionados y los cortes de tejido procesados con técnicas inmunohistoquímicas. Cuantificamos la inmunorreactividad frente a neurocán y colIV (A), y determinamos el porcentaje de área marcada con respecto al área total analizada. El área analizada fue determinada mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μ m del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μ m x 1000 μ m. El tratamiento agudo con Sal003 no afectó a la expresión de neurocán (d y B) ni a la de colIV (h y C) en los animales lesionados. Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, cinco animales por tratamiento (Control, n=5; Control + Sal003, n=6; Lesión, n=6; Lesión + Sal003, n=6). * $p < 0,05$. Barra de escala = 100 μ m.

3.4. Efecto del Salubrinal en un modelo *in vivo* de lesión con un tratamiento crónico y muerte a los 21 dpl

Una vez evaluado el efecto del tratamiento agudo del Salubrinal sobre la cicatriz en la fase de consolidación, estudiamos su efecto al administrarlo crónicamente. Para ello y, como explicamos en detalle en el apartado de *Material y Métodos* utilizamos animales lesionados y tratados con Sal003 cada 48 horas a partir de los 8 dpl, y sacrificados a los 21 dpl (tratamiento crónico, muerte a los 21 días).

Sobre las secciones procesadas, realizamos técnicas inmunohistoquímicas y evaluamos la expresión de GFAP, Iba1 y fibronectina (Figura 23 A). Al igual que en los casos anteriores, tanto la expresión de GFAP ($p < 0,01$), como la de Iba1 ($p < 0,05$), y la de fibronectina ($p < 0,01$), aumentaron significativamente en los animales lesionados con respecto a los controles. El tratamiento crónico con Sal003 aumentó significativamente la expresión de GFAP y, por tanto, la reactividad astrocitaria ($p < 0,05$) (Figura 23 A d y B). En el caso de la reactividad microglial, el Sal003 mostró una leve tendencia a aumentar la expresión de Iba1, aunque dicho incremento no fue estadísticamente significativo (Figura 23 A h y C). Por último, el tratamiento con Sal003 no causó variaciones sobre la expresión de fibronectina (Figura 23 A l y D).

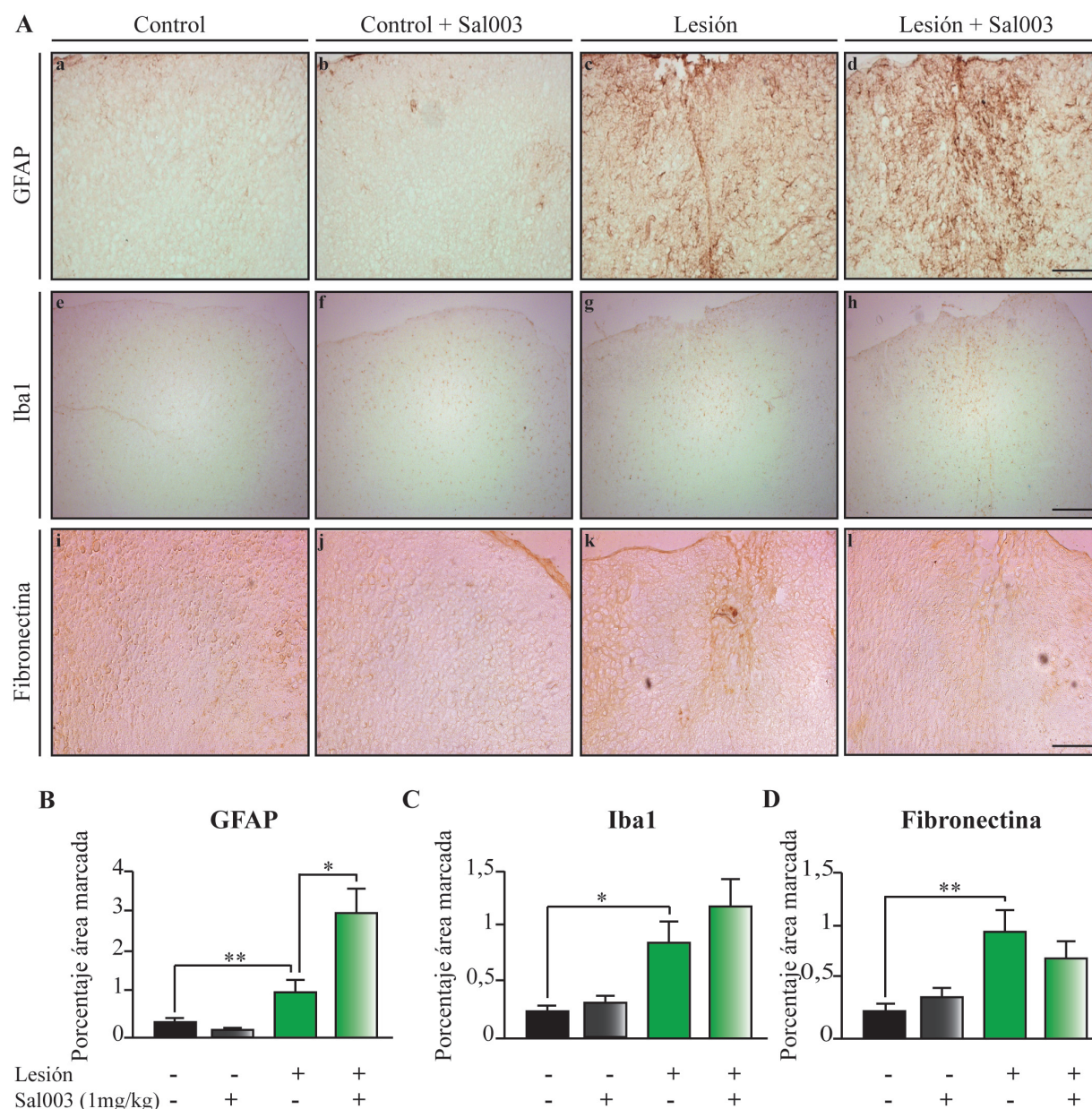


Figura 23: Efecto del Salubrinal sobre la inmunorreactividad astrogial y microglial y en el marcaje de fibronectina tras una lesión con un tratamiento crónico y muerte a los 21 dpl. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con cortes de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 a partir de los 8 días postlesión, cada 48 horas, y sacrificados a los 21 dpl. Medimos la expresión de GFAP como marcador de astrocitos, de Iba1 como marcador de microglía y de fibronectina (A), y se determinó el porcentaje de área marcada con respecto al total de área analizada. El área analizada se determinó mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μ m del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μ m x 1000 μ m. El tratamiento crónico con Sal003 incrementó significativamente la expresión de GFAP en los animales lesionados (d y B) y causó un aumento discreto sobre la expresión de Iba1 (h y C). Sin embargo, no afectó a la expresión de fibronectina (l y D). Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, siete animales por tratamiento (Control, n=8; Control + Sal003, n=9; Lesión, n=9; Lesión + Sal003, n=8). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Barra de escala = 100 μ m.

Las dos aproximaciones al ensayo *in vivo* de formación de la cicatriz glial en su fase de consolidación, demostraron que la administración de un tratamiento u otro con Salubrinal (agudo o crónico) variaba el patrón de expresión de inmunorreactividad glial y de componentes celulares principales de la cicatriz, como son GFAP, Iba1 y fibronectina. Como se muestra en la Tabla 9, el tratamiento agudo no afecta a la población de astrocitos y disminuye muy significativamente la reactividad microglial ($p < 0,01$). Sin embargo, tiene efectos sobre la expresión de fibronectina, aumentándola muy significativamente ($p < 0,01$). Por otro lado, el tratamiento crónico, aumenta significativamente los niveles de reactividad astrogial ($p < 0,05$), y no afecta a la reactividad microglial ni a la expresión de fibronectina.

		Control	Control + Sal003	Lesión	Lesión + Sal003
GFAP	Tratamiento agudo	0,32 ± 0,06	0,64 ± 0,08	1,15 ± 0,23	0,89 ± 0,21
	Tratamiento crónico	0,32 ± 0,06	0,24 ± 0,09	1,15 ± 0,23	3,04 ± 0,66
Iba1	Tratamiento agudo	0,24 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,85 ± 0,21	0,18 ± 0,02
	Tratamiento crónico	0,24 ± 0,03	0,32 ± 0,08	0,85 ± 0,21	1,17 ± 0,25
Fibronectina	Tratamiento agudo	0,23 ± 0,07	0,42 ± 0,09	0,99 ± 0,20	3,89 ± 0,31
	Tratamiento crónico	0,23 ± 0,07	0,23 ± 0,08	0,99 ± 0,20	0,71 ± 0,14

Tabla 9: Variación en el efecto del tratamiento agudo y crónico con Salubrinal tras una lesión y sacrificio a los 21 dpl. La tabla resume la cuantificación de la expresión de GFAP, Iba1 y fibronectina en los ratones Control, Control + Sal003, Lesión, y Lesión + Sal003 sacrificados a los 21 dpl, tras tratamientos agudo o crónico con Sal003. El tratamiento de animales lesionados con Sal003 no afectó los niveles de expresión de GFAP en el tratamiento agudo, pero los aumentó significativamente tras el tratamiento crónico. El marcaje de Iba1 disminuyó muy significativamente en los animales lesionados y con tratamiento agudo de Sal003, pero no varió tras el tratamiento crónico. El tratamiento con Sal003 en animales lesionados aumentó muy significativamente los niveles de expresión de fibronectina tras el tratamiento agudo, pero no los afectó tras el tratamiento crónico. Los resultados representan la media ± SEM de, al menos, cinco animales por grupo experimental.

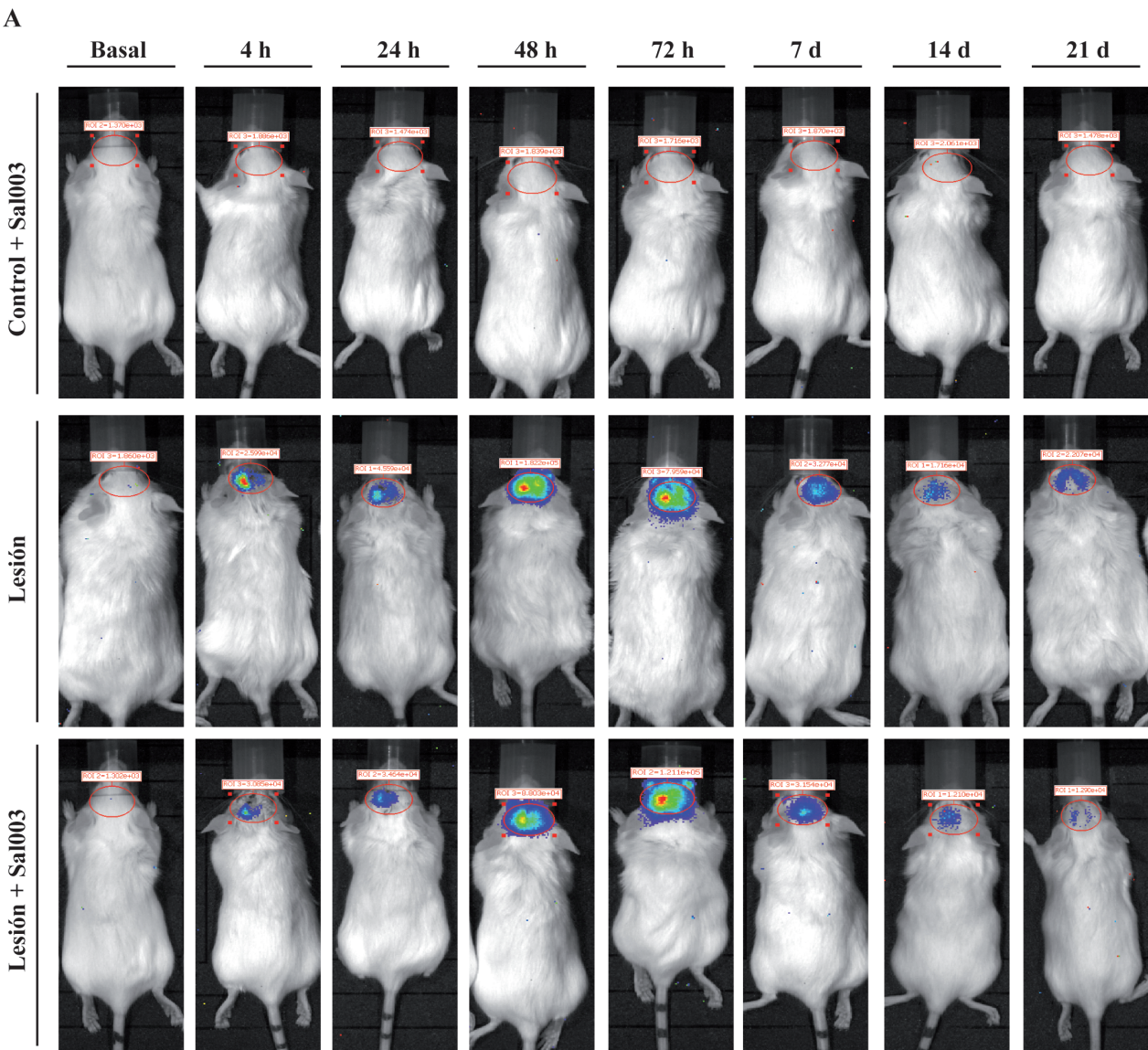
3.5. Efecto del Salubrinal sobre la ruta del TGFβ tras una lesión

Como el tratamiento agudo con Salubrinal aumentó mucho la expresión de fibronectina en los animales sacrificados a los 21 dpl, examinamos si, en nuestro modelo *in vivo* de cicatriz glial, dicho efecto era debido a un efecto de la droga sobre la ruta del TGFβ.

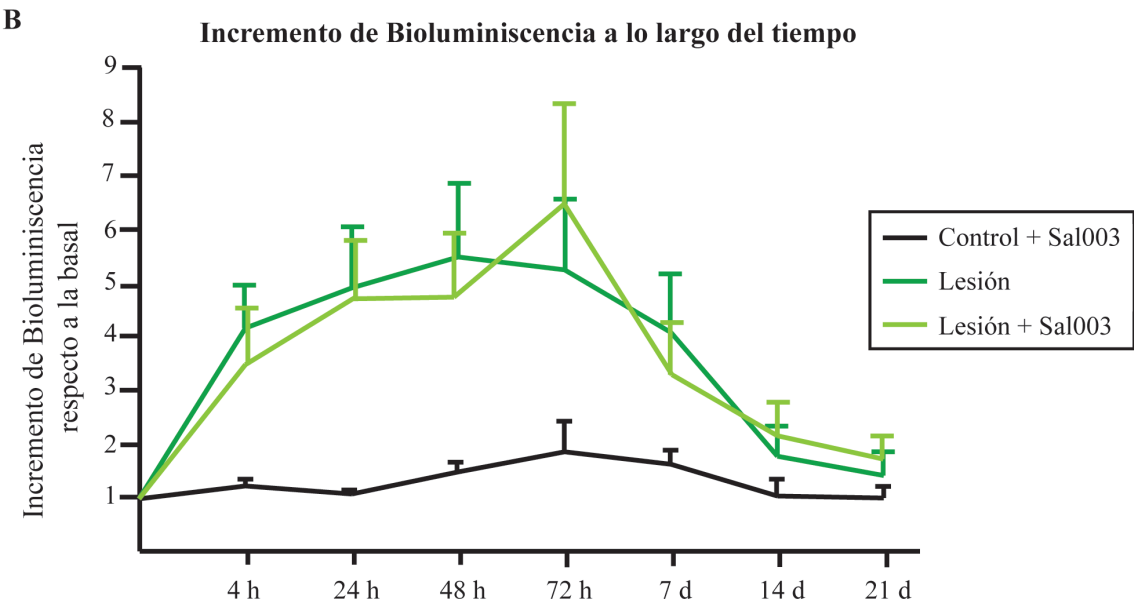
La activación del receptor de TGF β induce la fosforilación de las proteínas Smad2/3. Una vez fosforiladas, Smad2/3 se unen a Smad4 y juntas se translocan al núcleo, donde regulan la transcripción génica mediante su unión a elementos Smad (Smad binding elements; SBE) en los promotores de sus genes diana. Estudios previos han demostrado que los ratones transgénicos SBE/Tk-Luc son un buen modelo para estudiar la activación temporal y específica de tejido de la cascada de señalización Smad2/3 en ratones y, por tanto, la activación de la vía de TGF β (Lin et al., 2005; Luo et al., 2006).

Para estudiar el efecto *in vivo* del Salubrinal sobre la ruta del TGF β , practicamos una lesión mecánica similar a la de los experimentos anteriores sobre ratones transgénicos SBE-luc (descritos en el apartado de *Material y Métodos*). Estos ratones fueron tratados con Sal003 durante 3 dpl (tratamiento agudo) y sacrificados a los 21 dpl. Durante ese tiempo medimos su bioluminiscencia a las 4, 24, 48 y 72 horas, y los 7, 14 y 21 días postlesión, y calculamos el incremento de bioluminiscencia a lo largo del tiempo postlesión (Figura 24). Todos los ratones lesionados experimentaron un incremento de bioluminiscencia con respecto a su medida basal, evidenciando la activación de la ruta del TGF β tras producirse una lesión en el SNC. Sin embargo, los ratones lesionados que fueron tratados con Sal003, no mostraron diferencias de expresión con respecto a los animales lesionados no tratados, por lo que el tratamiento agudo con Salubrinal no afecta a la ruta del TGF β en nuestro modelo *in vivo* de cicatriz glial. Por tanto, el aumento observado en la expresión de fibronectina no es debido a ello.

Figura 24 (página siguiente): El Salubrinal no afecta a la activación de la ruta del TGF β en animales SBE-luc. Los ratones transgénicos SBE-luc fueron lesionados y divididos en dos grupos experimentales (Control + Sal003 y Lesión + Sal003), a los que se les realizó un tratamiento agudo con Sal003 (durante los 3 primeros días postlesión). Durante 21 días tras la lesión, se midió la bioluminiscencia a diferentes tiempos (4, 24, 48 y 72 horas, 7, 14 y 21 días) (A). Antes de comenzar el experimento (t=0), se midió la bioluminiscencia basal de cada uno de los animales, lo que se utilizó para relativizar cada medida posterior. La administración de Sal003 a animales transgénicos SBE-luc lesionados no tuvo ningún efecto en la ruta de activación de TGF β inducida por el daño, no habiendo diferencias entre las medidas de los animales Lesión y los animales Lesión + Sal003 (B). Los resultados representan la media \pm SEM de, al menos, seis animales por grupo experimental.



Resultados



3.6. Posibles causas de la reactividad glial ocasionada por el Salubrinal

Una vez visto el efecto del Salubrinal en nuestro modelo *in vivo* de cicatriz, estudiamos las posibles causas de la reactividad glial que mostraban las cuantificaciones de la inmunorreactividad para GFAP y Iba1. Para ello, analizamos las moléculas implicadas en la reactividad en el caso de los astrocitos y vimos el efecto que causaba el Salubrinal en la microglía.

En el caso de la reactividad astrocitaria, incubamos cultivos de astrocitos con Sal003 y con el factor de crecimiento TGF β y determinamos la expresión de ARNm para proteínas proinflamatorias mediante la técnica de qPCR. Después de 24 horas de tratamiento evaluamos la expresión de ARNm para GFAP, IL-1 β e IL-6. Como control endógeno para relativizar la expresión de los genes estudiados utilizamos la expresión del gen RPS29. El tratamiento con Sal003 disminuyó la expresión de ARNm para GFAP con respecto a los astrocitos tratados con TGF β (Figura 25 A). Por el contrario, aumentó la expresión para IL-1 β (Figura 25 B) e IL-6 (Figura 25 C).

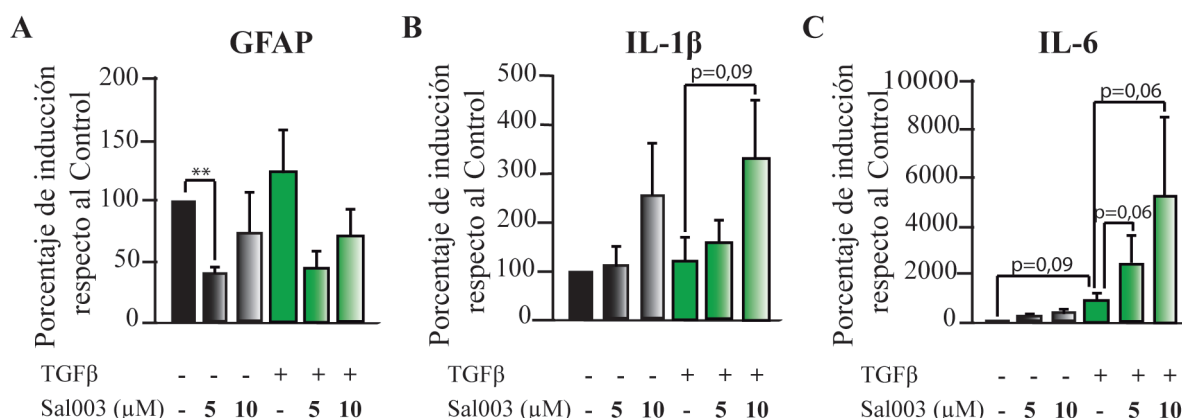


Figura 25: El Salubrinal incrementa la expresión de ARNm para proteínas inflamatorias inducidas en astrocitos por TGF β . Determinamos la expresión de ARNm para diferentes marcadores de reactividad glial mediante la técnica de qPCR. El Salubrinal redujo la expresión de GFAP (A) en cultivos de astrocitos tratados con TGF β durante 24 horas. Sin embargo, el tratamiento con Sal003 incrementó la expresión de ARNm para las proteínas proinflamatorias IL-1 β (B) e IL-6 (C) en astrocitos. Como control endógeno para relativizar la expresión de los genes utilizamos la expresión para RPS29. Los resultados representan la media del porcentaje de la inducción relativizada al control de la expresión de ARNm para cada uno de los genes / la expresión de ARNm para RPS29 \pm SEM de, al menos, cuatro experimentos, cada uno de ellos hecho por triplicado. ** $p < 0.01$.

Además de evaluar los niveles de ARNm, cuantificamos los niveles de secreción de proteínas y factores inflamatorios mediante un microarray de anticuerpos. Para ello, pretratamos con Sal003 cultivos de astrocitos y, a continuación, añadimos TGFβ. Tras 24 horas de tratamiento, recolectamos el sobrenadante y evaluamos los niveles de secreción de distintas citoquinas (Figura 26 A). Al ser proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria, como control positivo de la activación utilizamos el tratamiento de LPS+IFNγ, con efectos proinflamatorios en los astrocitos. El tratamiento con Sal003 aumentó los niveles de secreción de las proteínas y factores proinflamatorios IL-1β (Figura 26 B), IL-6 (Figura 26 C), IL-8 (Figura 26 D), GM-CSF (Figura 26 G), MCSF (Figura 26 H) y RANTES (Figura 26 I). Así mismo, también cuantificamos el nivel de secreción de VEGF, que aumentó en los astrocitos tratados con Sal003 (Figura 26 K). En este caso utilizamos la droga DFO como control positivo.

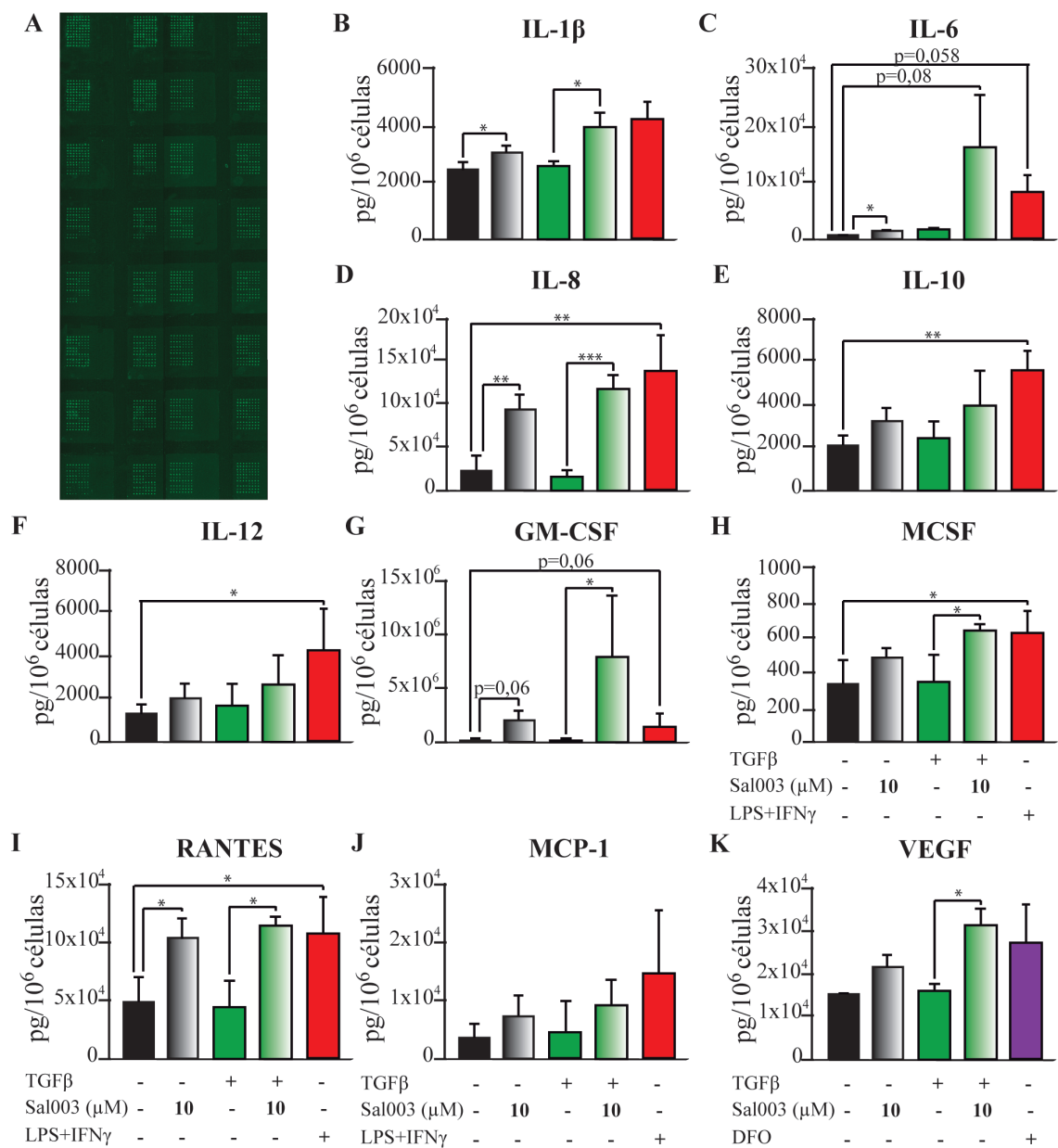


Figura 26 (página anterior): El Salubrinal incrementa la secreción de proteínas y factores proinflamatorios y de VEGF en astrocitos. Determinamos el nivel de la secreción al medio de proteínas y factores mediante un microarray de anticuerpos (A). El tratamiento con Sal003 incrementó la secreción de las proteínas y factores proinflamatorios IL-1 β (B), IL-6 (C), IL-8 (D), GM-CSF (G), MCSF (H) y RANTES (I), así como del factor proangiogénico VEGF (K) en medios condicionados de cultivos de astrocitos tratados con TGF β durante 24 horas. Como control positivo de inflamación utilizamos el tratamiento con LPS+IFN γ , y para VEGF utilizamos DFO. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Por otra parte, evaluamos el efecto del Salubrinal sobre las células de microglía. La primera aproximación que realizamos fue analizar su efecto sobre la viabilidad y el metabolismo de las células microgliales. Con ese fin hicimos un ensayo de incorporación de MTT a 24, 48 y 72 horas. Las células fueron tratadas con LPS y examinamos si el tratamiento con Sal003 afectaba a la viabilidad microglial. Tanto a 24 (Figura 27 A), como a 48 (Figura 27 B), y a 72 horas (Figura 27 C), el Salubrinal no causó ningún efecto en la viabilidad y el metabolismo de la microglía.

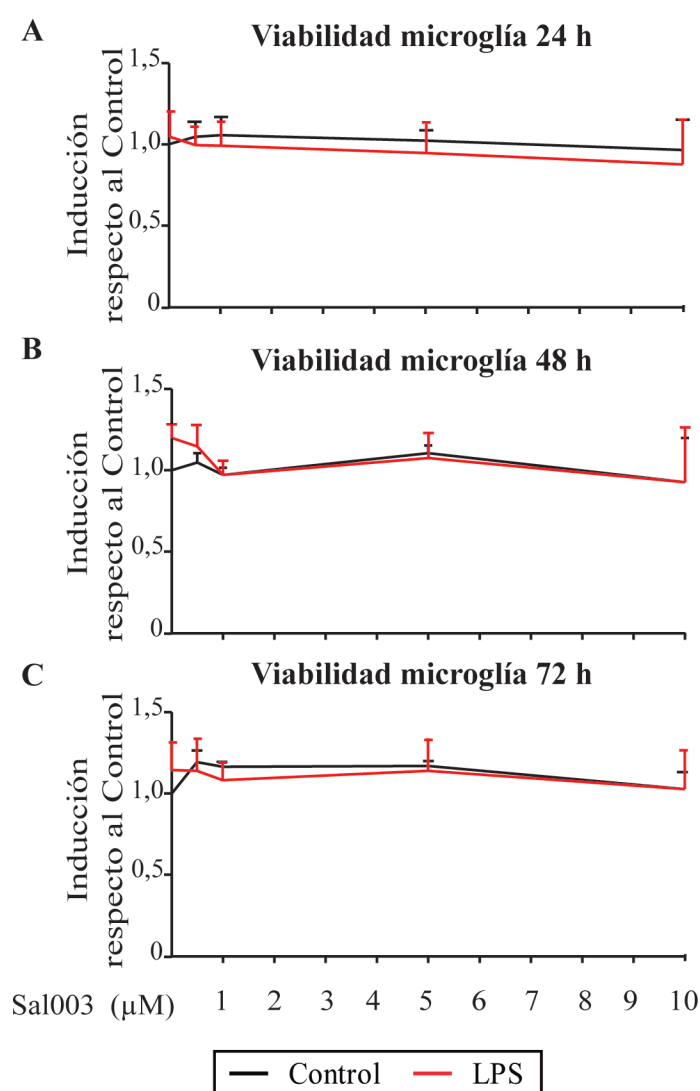


Figura 27: El Salubrinal no afecta ni a la viabilidad ni al metabolismo de la microglía. El tratamiento con dosis crecientes de Sal003 (0,5, 1, 5 y 10 μ M) y 10 ng/ml de LPS durante 24 horas (A), 48 (B) y 72 horas (C) no causó ningún efecto en la viabilidad microglial. Los resultados representan la media \pm SEM de la inducción de la viabilidad celular respecto al control de tres experimentos, cada uno de ellos realizado por triplicado.

A continuación, estudiamos su efecto inflamatorio a través de la actividad de la enzima iNOS, mediante la medida de la acumulación de nitritos secretados en el medio de cultivo. El estudio se llevó a cabo a 24, 48 y 72 horas, al igual que en el caso de la viabilidad celular. Los cultivos de microglía se trataron con LPS, como inductor de inflamación, y se analizó si el tratamiento con Sal003 aumentaba o disminuía dicha inflamación. El Salubrinal no afectó a la producción de óxido nítrico ni a 24, ni 48, ni 72 horas (Figura 28), por lo que no tenía efecto inflamatorio en cultivos de microglía.

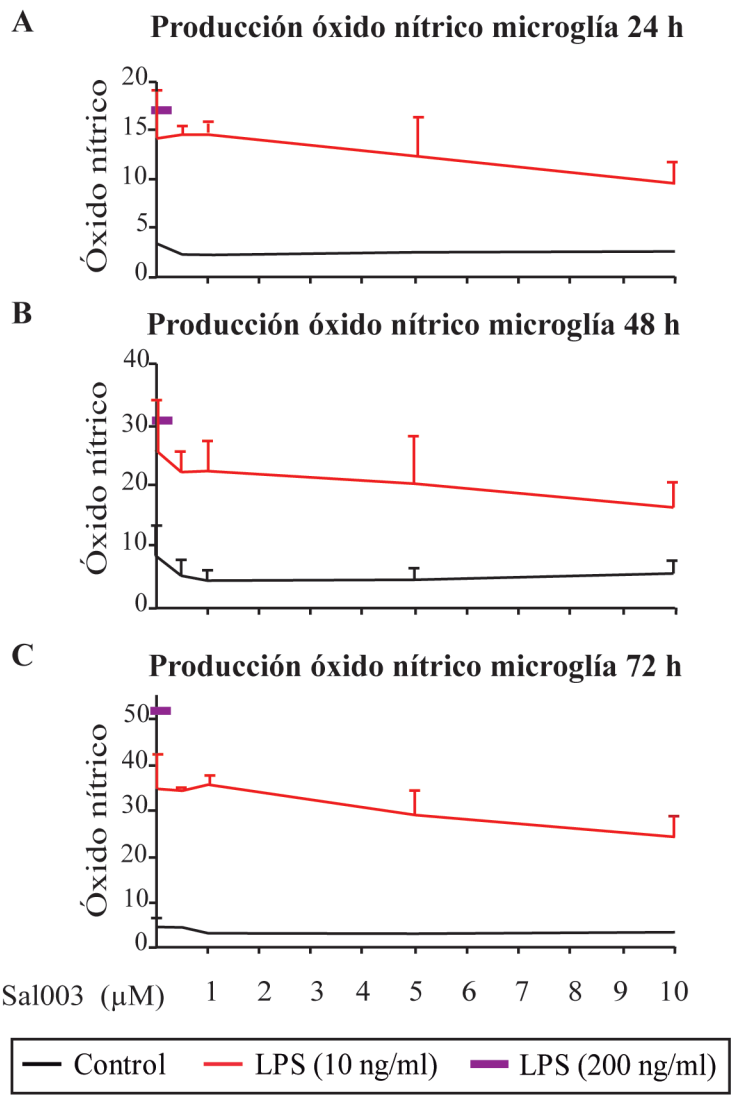


Figura 28: El Salubrinal no afecta a la producción de óxido nítrico por la microglía. El tratamiento con dosis crecientes de Sal003 (0,5, 1, 5 y 10 μM) durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C) no causó ningún efecto sobre la producción de óxido nítrico tras el tratamiento con LPS (10 ng/ml). Como control positivo de la activación, utilizamos una dosis saturante de 200 ng/ml de LPS. Los resultados representan la media ± SEM de la producción de óxido nítrico de tres experimentos, cada uno de ellos hecho por triplicado.

Todo esto indica que el Salubrinal tiene efecto inflamatorio sobre los astrocitos, induciendo la secreción de citoquinas proinflamatorias. Además, también tiene un efecto proangiogénico, al inducir la expresión del factor VEGF. Sin embargo, no afecta a la respuesta inflamatoria de las células de microglía en cultivo.

3.7. Efecto inflamatorio del Salubrinal *in vivo*: lesión y tratamiento agudo

A continuación, evaluamos el efecto del Salubrinal sobre el fenotipo microglial en el modelo *in vivo* de lesión con tratamiento agudo y sacrificio los 3 dpl.

En primer lugar, estudiamos si el tratamiento agudo con Salubrinal tenía algún efecto sobre la integridad de la BHE en la zona de lesión, determinando la inmunorreactividad frente a las inmunoglobulinas IgG de la sangre en el tejido cerebral. Los animales lesionados incrementaron significativamente los niveles de IgG con respecto a los controles ($p < 0,05$) (Figura 29 A c y B). Además, en los animales tratados con Sal003 observamos un leve aumento de marcaje para IgG con respecto a los animales lesionados no tratados del 35%, pero, sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Figura 29 A d y B).

A continuación, estudiamos la inmunorreactividad frente a CD16/CD32 (marcador de fenotipo proinflamatorio o M1 de microglía/macrófago) y frente a arginasa 1 (marcador de fenotipo antiinflamatorio o M2 de microglía/macrófago) (Kigerl et al., 2009; David and Kroner, 2011). La inmunorreactividad frente a CD16/CD32 aumentó más del doble en los animales lesionados respecto a los controles, demostrando la reacción inflamatoria producida tras la lesión (Figura 29 A g y C). Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto a la inmunorreactividad frente a arginasa 1 entre el grupo de animales lesionados y el grupo control. Tampoco se observaron diferencias tanto para CD16/CD32 (Figura 29 A h y C), como para arginasa 1 (Figura 29 A l y D) en los animales tratados con Sal003 con respecto a los animales lesionados. Por lo tanto, el Salubrinal no parece alterar la polarización hacia ningún fenotipo microglial en particular.

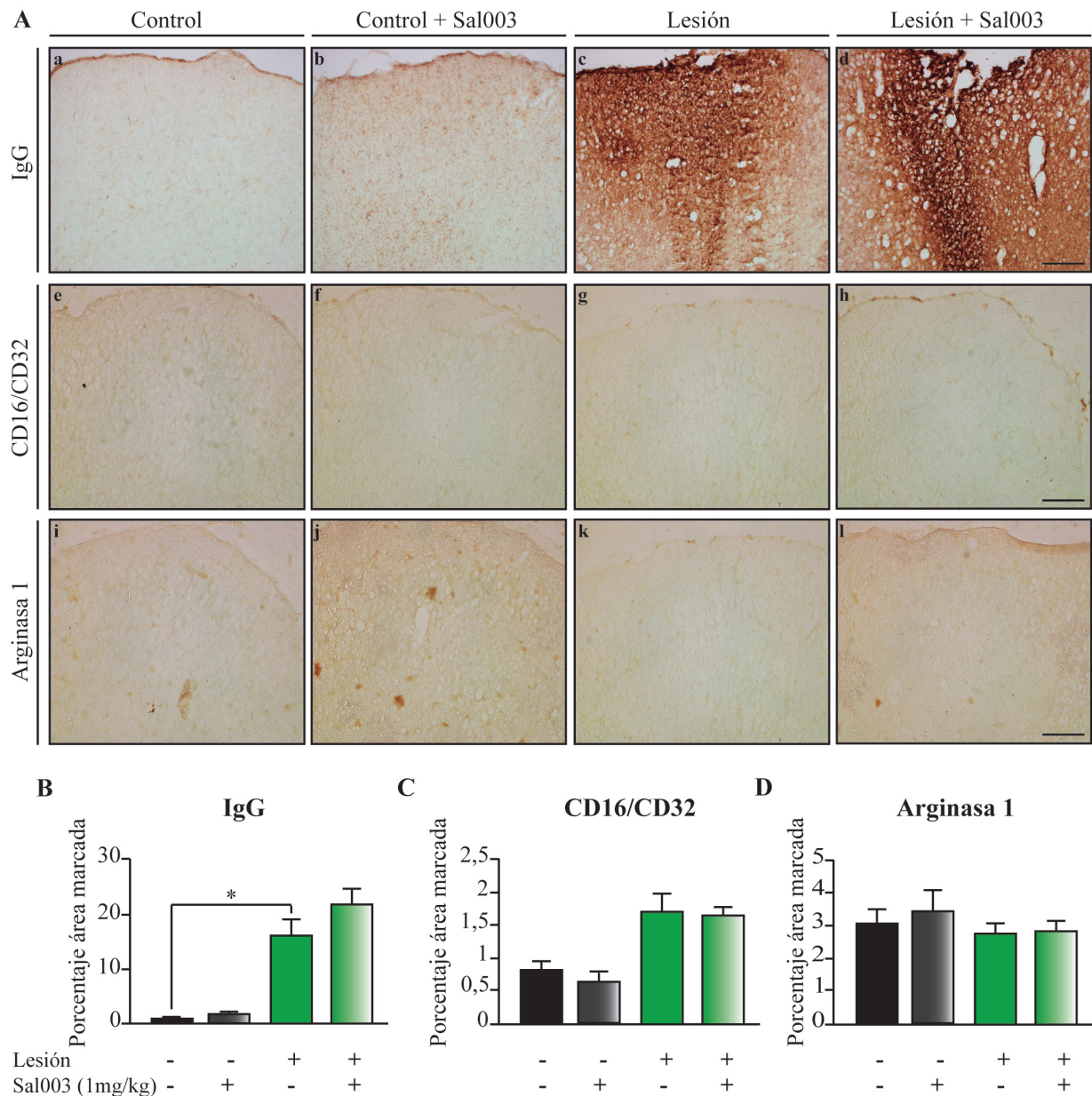


Figura 29: Efecto del Salubrinal sobre la inmunorreactividad frente a IgG, CD16/CD32 y arginasa 1 en cerebros de animales lesionados con tratamiento agudo y muerte a los 3 dpl. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con cortes de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 3 dpl. Examinamos la expresión de inmunoglobulinas IgG, así como el fenotipo microglial mediante el marcaje con CD16/CD32 y con arginasa 1 (A), determinando el porcentaje de área marcada con respecto al área total analizada. El área analizada se determinó mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μm del centro de la lesión y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm . El tratamiento con Sal003 incrementó levemente la expresión de IgG en los animales lesionados (d y B). Sin embargo, no afectó a la expresión de CD16/CD32 (h y C) ni a la de arginasa 1 (l y D). Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, tres animales por tratamiento (Control, n=5; Control + Sal003, n=5; Lesión, n=5; Lesión + Sal003, n=7). * $p<0,05$. Barra de escala = 100 μm .

3.8. Efecto fibrótico del Salubrinal en un modelo *in vivo* de lesión en un tratamiento agudo y muerte a los 3 dpl

Tras el estudio de la fase inflamatoria y vistos los resultados del marcaje de fibronectina en el modelo de fase aguda y tratamiento agudo, estudiamos la posible causa de los efectos del Salubrinal sobre la fibrosis.

En diversos estudios se ha demostrado el papel del factor mitogénico PDGF en la fibrosis y su implicación en diferentes enfermedades (Alvarez et al., 2006; Trojanowska, 2008). Por ello, para comprobar si existía una relación entre el PDGF y nuestros resultados de inmunorreactividad para fibronectina, evaluamos los niveles del factor PDGF tipo B (PDGF-B) en nuestras muestras de tejido de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a continuación (tratamiento agudo, muerte a los 3 días). Los estudios histológicos mostraron que el tratamiento con Sal003 aumentó significativamente la expresión de PDGF-B con respecto a los animales lesionados no tratados. El aumento fue superior a 3 veces ($p < 0,05$) (Figura 30).

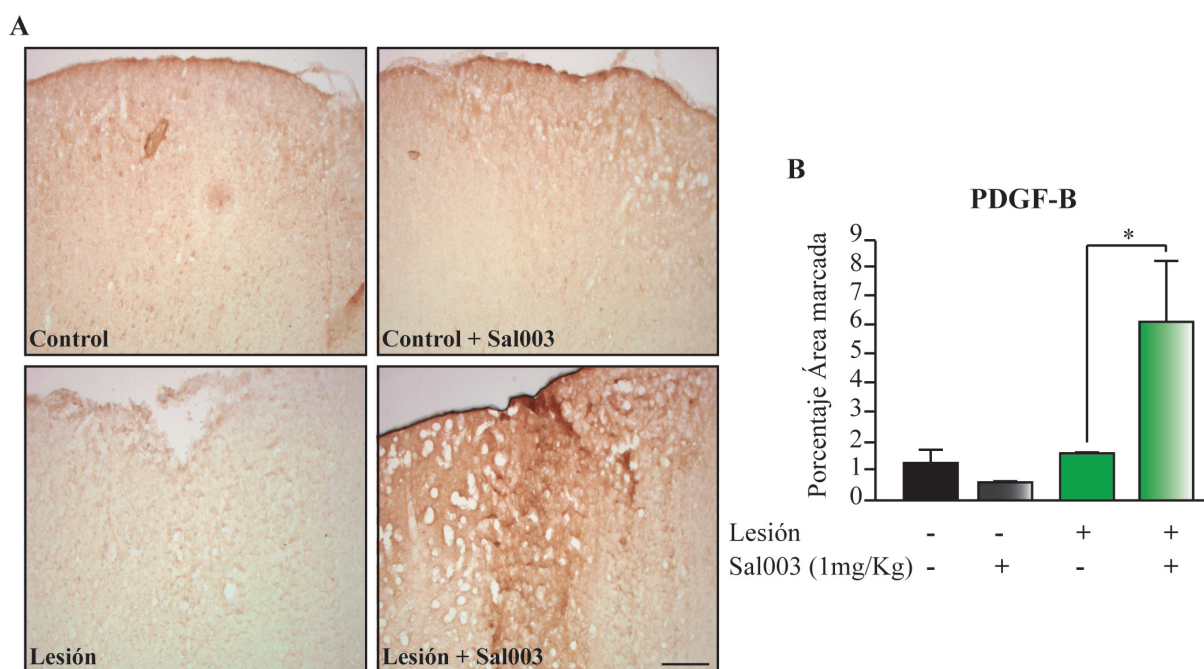


Figura 30: El tratamiento agudo con Salubrinal aumenta el marcaje de PDGF-B tras la lesión. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con cortes de tejido procedentes de ratones lesionados, tratados con Sal003 durante 3 dpl y sacrificados a los 3 dpl. Examinamos la expresión de PDGF-B (A), y determinamos el porcentaje de área marcada con respecto al área total analizada. El área analizada fue determinada mediante el conjunto de dos áreas a ambos lados de la lesión, delimitadas por un rectángulo distante 100 μ m del centro

de la lesión y de un tamaño de 200 μm x 1000 μm . El tratamiento con Sal003 aumentó significativamente la expresión de PDGF-B con respecto a los animales lesionados (B). Los experimentos representan la media \pm SEM de, al menos, tres animales por tratamiento (Control, n=4; Control + Sal003, n=3; Lesión, n=5; Lesión + Sal003, n=4). * $p < 0,05$. Barra de escala = 100 μm .

A continuación, examinamos la identidad de las células PDGF-B inmunorreactivas en la zona de la lesión. Para ello llevamos a cabo comarcajes del anticuerpo anti-PDGF-B junto con marcadores de células nerviosas, como las neuronas (con anti-NeuN), los astrociotos (con anti-GFAP) y la microglía (con anti-Iba1) en cortes de tejido de animales lesionados y tratados con Sal003 3dpl, siendo sacrificados a continuación (tratamiento agudo, muerte a los 3 días) (Figura 31). El marcaje para PDGF-B colocalizó mayoritariamente con NeuN (Figura 31 d), mientras que la colocalización con GFAP (Figura 31 h) o con Iba1 (Figura 31 m) fue casi inexistente. Tras cuantificar de las células que expresaban PDGF-B, estimamos que un $84,45\% \pm 4,94$ también expresaba el marcador neuronal NeuN, un $0,62\%$ expresaba el marcador astrogliotial GFAP, y un $0,82\%$ expresaba el marcador microglial Iba1.

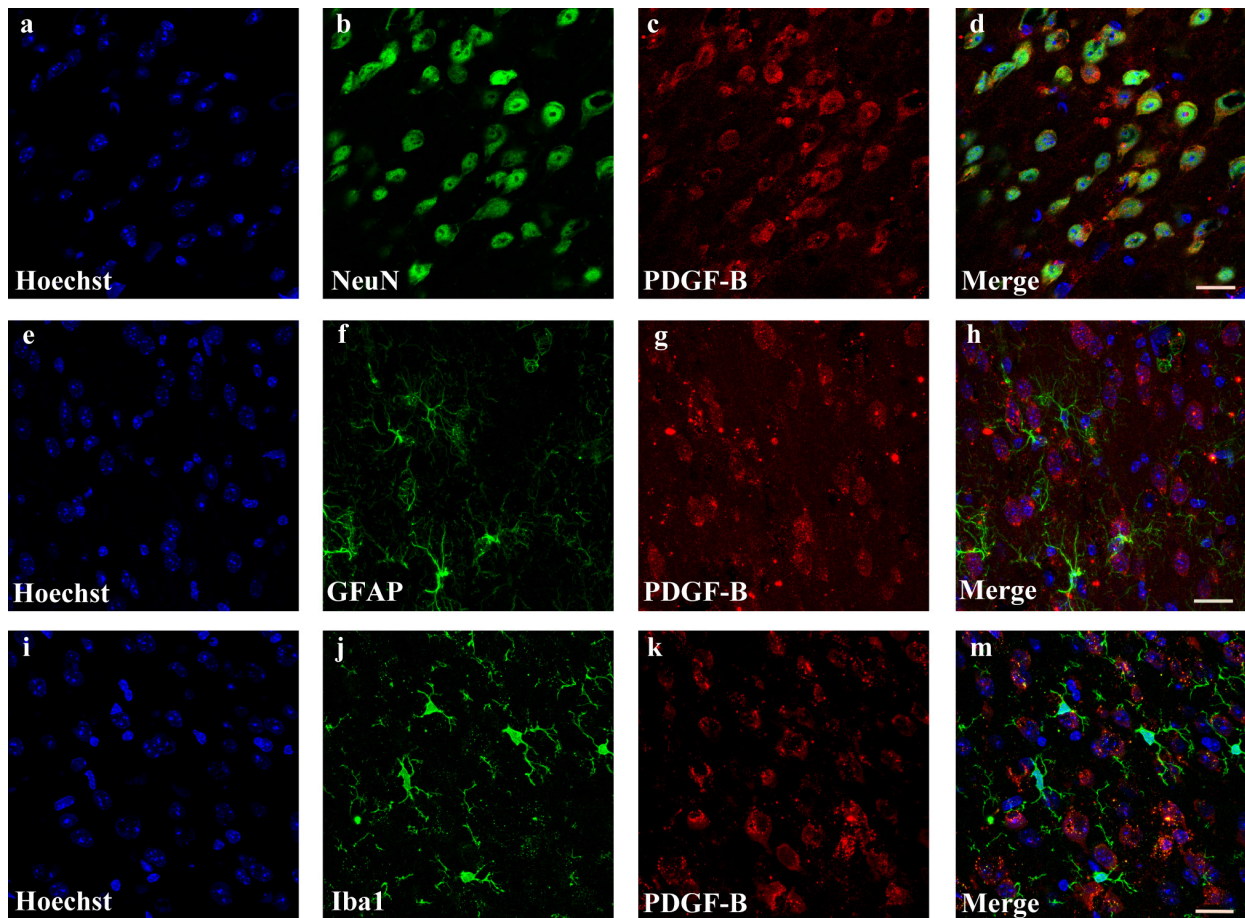


Figura 31 (página anterior): Las neuronas son el tipo celular que presenta mayoritariamente inmunorreactividad frente a PDGF-B. Realizamos técnicas inmunohistoquímicas con cortes de tejido procedentes de ratones lesionados y tratados con Sal003 durante 3 dpl. Se llevaron a cabo comarques con los anticuerpos anti-PDGF-B (c, g, k) y anti-NeuN (b), anti-GFAP (f), o anti-Iba1 (j), y con Hoechst 33342 para teñir los núcleos de las células (a, e, i). El PDGF-B fue expresado principalmente por células neuronales (d). Barra de escala = 20 μ m.

Por todo ello, el tratamiento agudo con Salubrinal aumenta la expresión de fibronectina tras la lesión. Este aumento está provocado por un aumento del factor PDGF-B, que mayoritariamente está producido por las neuronas presentes en la zona lesionada.

3.9. Efecto del Salubrinal sobre la extravasación al parénquima nervioso en un modelo *in vivo* de lesión

Por último, una vez estudiados los efectos de la droga Salubrinal sobre la cicatriz glial, evaluamos si podía tener un efecto beneficioso sobre la extravasación de células sanguíneas al parénquima nervioso tras una lesión.

Para ello, utilizamos muestras procedentes de animales lesionados y tratados con Salubrinal. Los ratones fueron tratados con Sal003 durante 3dpl y sacrificados a los 14 dpl, tiempo en el que la cicatriz ya está formada y empieza a consolidarse. Tras este tiempo, comprobamos el nivel de extravasación a la corteza cerebral con colorante Evans Blue, previamente inyectado en sangre. Como muestra la Figura 32, la extravasación se incrementó un 20% en los animales lesionados con respecto a los controles ($p=0,057$). El tratamiento de los animales lesionados con Sal003 redujo significativamente la extravasación a la corteza cerebral con respecto a los animales lesionados no tratados, retornando los niveles a los valores control ($p<0,05$).

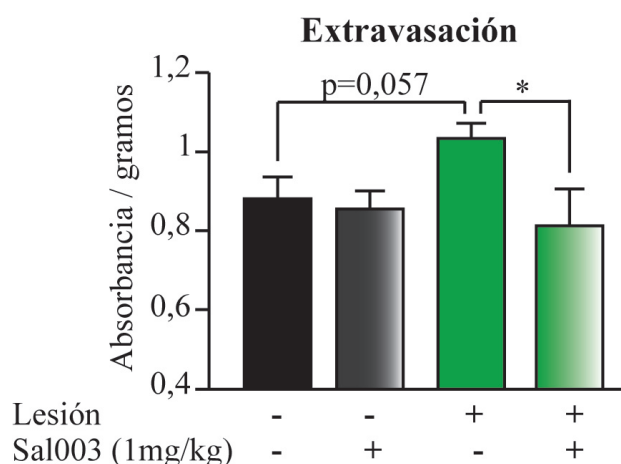
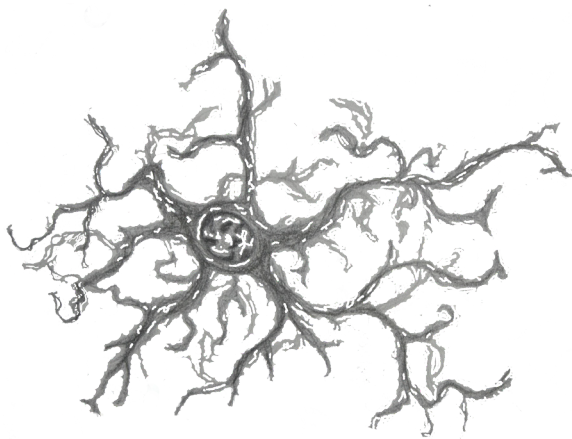


Figura 32 (página anterior): El Salubrinal reduce la extravasación del colorante Evans Blue a la corteza cerebral tras una lesión. Para determinar la extravasación del colorante Evans Blue, medimos la absorbancia a 630 nm de la corteza cerebral procesada de animales lesionados, tratados durante 3 dpl y sacrificados a 14 dpl. Los resultados se representan como el ratio de la absorbancia por gramos de tejido del hemisferio ipsilateral respecto del contralateral de cada animal. El tratamiento con Sal003 disminuyó significativamente la extravasación a la corteza cerebral con respecto a los animales lesionados, que la aumentaron con respecto a los animales control. La medida representa la media \pm SEM de, al menos, 3 animales por tratamiento (Control, n=3; Control + Sal003, n=4; Lesión, n=7; Lesión + Sal003, n=6). * $p < 0.05$.

Así, el tratamiento con Salubrinal tiene un efecto reductor de la extravasación al parénquima nervioso tras una lesión lacerante en la corteza cerebral de ratón.



Discusión

Tras una lesión en el SNC, los astrocitos y las células mesenquimales forman una nueva *glia limitans* entre el tejido nervioso dañado y el resto del organismo, segregando al tejido lesionado proteínas de ECM. La cicatriz glial formada limita la entrada de sustancias proinflamatorias y la migración de células del torrente sanguíneo al parénquima nervioso, reduciendo la muerte neuronal secundaria y la extensión del daño debido a la reacción inflamatoria (Raposo and Schwartz, 2014). Sin embargo, la cicatriz glial también es uno de los principales impedimentos para la regeneración axonal (Hu et al., 2010). Debido a ello, la correcta modulación de la cicatriz favorecería la regeneración y, por tanto, la recuperación funcional tras el daño.

La ECM tiene un papel fundamental en el desarrollo del SNC, en la regulación de las sinapsis, en las enfermedades neurodegenerativas y en la reparación tras una lesión (Lukes et al., 1999; Franco and Muller, 2011; Pyka et al., 2011). Esta estructura está compuesta principalmente por proteoglicanos, en especial de CSPGs, que también forman parte de la cicatriz glial junto con otras moléculas profibróticas. Estos proteoglicanos inhiben el crecimiento neurítico a través de la interacción de su núcleo proteico y sus cadenas glicosiladas con las neuronas presentes en la zona lesionada (Beller and Snow, 2014).

La inhibición de la regeneración axonal por parte de la cicatriz conlleva una pérdida de actividad del tejido lesionado y, por tanto, déficits funcionales para el individuo. Desde hace varias décadas, se han investigado diferentes terapias que posibiliten la regeneración tras una lesión (Smith-Thomas et al., 1995; Rodrigues et al., 2002; Silver and Miller, 2004; Fitch and Silver, 2008). El control de la síntesis y secreción de proteoglicanos y proteínas de la ECM se lleva a cabo en el RER, y cuando ocurre una situación de estrés, como es una lesión, aumenta el estado de fosforilación del factor eIF2 α , reduciendo la síntesis de proteínas en el RER. Por ello, en este estudio utilizamos como posible droga prorregeneradora el Salubrinal, ya que es capaz de mantener eIF2 α en su estado fosforilado. Así, a parte de su efecto neuroprotector (Lin et al., 2008; Saxena et al., 2009; Huang et al., 2012), el Salubrinal modularía la formación de la cicatriz glial y posibilitaría la recuperación funcional.

1. El Salubrinal reduce la traducción y la transcripción de proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos

Los astrocitos son los principales productores de CSPGs y de otras moléculas profibróticas que forman la cicatriz glial (Bovolenta et al., 1992). Para ello, expresan factores de crecimiento, como el TGF β o el EGF, aumentando así la expresión de proteoglicanos en la zona de la lesión para formar la cicatriz glial (Makower et al., 1988; Lagord et al., 2002).

En este estudio, para evaluar el efecto del Salubrin al sobre la expresión y secreción de proteoglicanos y proteínas profibróticas, utilizamos cultivos de astrocitos procedentes de cortezas cerebrales murinas, a los que tratamos con los factores de crecimiento TGF β o EGF. Tras comprobar el aumento en la expresión de los CSPGs al tratar los cultivos con los factores de crecimiento, mostramos que el Salubrin al reducía dicha expresión y secreción (Figuras 10 y 11) y, en concreto, reducía la expresión y secreción de brevicán, un proteoglicano altamente inducido en la cicatriz glial y fuertemente inhibitorio del crecimiento neurítico (Morgenstern et al., 2002). También disminuyó la expresión de CS56, un antígeno presente en las cadenas glicosiladas de CSPGs, inducidos por TGF β o EGF, y que está localizado en el citoplasma y la membrana plasmática de los astrocitos (Hayashi et al., 2007). Además, el Salubrin al inhibía la expresión y secreción de CTGF. Este factor profibrótico expresado en astrocitos reactivos y células endoteliales, induce la proliferación de células mesenquimales y la expresión de proteínas profibróticas, que participan en la formación de la cicatriz glial (Schwab et al., 2001; Conrad et al., 2005). Los efectos del Salubrin al sobre la expresión y secreción de proteínas no se debieron a un efecto ni sobre la viabilidad de los astrocitos en cultivo (Figura 12), ni sobre la ruta del TGF β (Figura 13).

A continuación, examinamos si el Salubrin al afectaba la transcripción inducida por TGF β o EGF. El Salubrin al reducía la expresión de ARNm para los proteoglicanos neurocán, brevicán, fosfacán, la proteína CTGF, la enzima XylT-1 y el factor de polimerización CPF (Figura 14). Así, nuestro estudio muestra por primera vez que el Salubrin al inhibe la transcripción de los CSPGs y las proteínas profibróticas, por lo que su efecto no se limita a la inhibición de la traducción proteica, sino que también disminuye la transcripción inducida por TGF β o EGF en cultivos de astrocitos. Recientemente, Reid y colaboradores han demostrado que, durante la respuesta al estrés del RE, los complejos de transcripción de ARNm - ribosomas del RE, son capaces de liberarse selectivamente de la membrana del RE (Reid et al., 2014). Este mecanismo reduce transitoriamente el flujo de las proteínas en el RE y restaura la proteostasis. Como otros inductores del estrés del RE, el Salubrin al induce la fosforilación de eIF2 α y atenúa la traducción de ARNm a proteínas, incluyendo los CSPGs y CTGF. Por ello, en este estudio proponemos que el Salubrin al podría inducir la liberación de ARNm de los CSPGs y CTGF de la membrana del RE. Además, si el tratamiento con Salubrin al se prolongase en el tiempo, podría inducir la degradación del ARNm de estos proteoglicanos y proteínas profibróticas. Este efecto sería aditivo al efecto directo del Salubrin al en la inhibición de la traducción de CSPGs y CTGF mediante el aumento de la fosforilación de eIF2 α . El efecto neto del Salubrin al sería disminuir el consumo de energía celular, reduciendo la transcripción y traducción de proteínas no necesarias en el RE, lo que aumentaría la supervivencia celular en condiciones adversas, como la hipoxia o la hipoglucemia (Lu et al., 2004).

2. El Salubrinal rescata de la inhibición del crecimiento neurítico en un modelo *in vitro* de cicatriz glial

Tras evaluar los efectos inhibidores de la transcripción y traducción de proteoglicanos y proteínas de ECM, principales inhibidores de la regeneración axonal tras una lesión, evaluamos el posible efecto beneficioso del Salubrinal en un modelo *in vitro* de cicatriz glial. Los astrocitos y las células mesenquimales (como fibroblastos meníngeos, fibroblastos perivasculares y pericitos) son las células más numerosas presentes en la zona de lesión, colaborando en la respuesta inhibitoria a la regeneración axonal (Cregg et al., 2014). Por ello, utilizamos el modelo descrito por Kimura-Kuroda y colaboradores, en el que se cocultivan fibroblastos y astrocitos tratados con TGF β y, sobre estos, se plaquean neuronas (Kimura-Kuroda et al., 2010). Evaluamos el efecto del Salubrinal en dicho modelo y su efecto en el crecimiento neurítico.

El estudio estereológico reveló que el Salubrinal favorecía el crecimiento neurítico de las neuronas corticales en el modelo *in vitro* de cicatriz glial, revirtiendo el efecto inhibitorio causado por el cocultivo de astrocitos y fibroblastos tratados con TGF β (Figura 16 B). Este efecto no se debe a que el Salubrinal afecte al número de neuronas presentes en el cocultivo, ya que la densidad neuronal permaneció constante en el análisis estereológico (Figura 16 C).

Por ello, el Salubrinal revierte la inhibición del crecimiento neurítico en el modelo *in vitro* de cicatriz glial. El aumento del crecimiento neurítico inducido por el tratamiento con Salubrinal puede deberse a la disminución en la secreción de CSPGs y proteínas profibróticas en los cocultivos de astrocitos y fibroblastos. En otros estudios se ha propuesto minimizar el efecto inhibitorio de los proteoglicanos sobre la regeneración axonal mediante su digestión enzimática por medio de la enzima condroitinasa (Silver and Miller, 2004). Nosotros proponemos que la reducción de CSPGs y de proteínas profibróticas por parte del Salubrinal disminuye el efecto inhibitorio sobre el crecimiento neurítico producido por los astrocitos reactivos y los fibroblastos tras la lesión, por lo que el efecto sería mucho más completo. Sin embargo, no podemos descartar que el Salubrinal pueda estar induciendo la secreción por parte de las células de factores neuritogénicos que promuevan la regeneración axonal. En ambos casos, el tratamiento con Salubrinal podría ser una terapia beneficiosa tras una lesión traumática, ya que reduce la formación de la cicatriz y, por tanto, facilita la regeneración axonal.

3. El Salubrinal promueve la supervivencia neuronal en un modelo de cicatriz glial

Demostrado el efecto inhibitor del Salubrinal en la transcripción y traducción de proteoglicanos y proteínas profibróticas, así como su efecto beneficioso en un modelo *in vitro* de cicatriz, estudiamos su efecto en un modelo de lesión lacerante de la corteza cerebral de ratones. La inserción en la corteza cerebral murina de una aguja origina una cicatriz glial en la masa encefálica perfectamente localizada. Es un modelo sencillo, reproducible de unos animales a otros y la lesión genera las condiciones necesarias para abordar un estudio detallado de la cicatriz glial característica de las lesiones traumáticas del SNC. El Salubrinal atraviesa la BHE, por lo que su administración se realizó mediante inyección intraperitoneal en solución tamponada.

A parte del efecto neuroprotector en modelos de isquemia/reperfusión, e hipoxia (Zhu et al., 2008; Lewerenz and Maher, 2009; Nakka et al., 2010), Orhi y colaboradores han demostrado que el Salubrinal reduce la pérdida de materia blanca inducida tras una lesión traumática gracias a su efecto citoprotector sobre los oligodendrocitos, produciendo mejoras funcionales después de una lesión de la médula espinal en ratones (Ohri et al., 2013). Así, el Salubrinal podría ser una terapia beneficiosa para las lesiones traumáticas del SNC, favoreciendo la supervivencia neuronal y oligodendroglial tras un trauma y reduciendo la formación de la cicatriz glial, facilitando así la regeneración axonal.

Por ello, estudiamos si el Salubrinal también favorecía la supervivencia neuronal en un modelo de lesión mecánica. El número de neuronas en los animales lesionados disminuyó con respecto al control (Figura 18). Sin embargo, el tratamiento agudo con Salubrinal incrementó significativamente la densidad neuronal en los animales lesionados, por lo que favorece la supervivencia neuronal tras una lesión en la corteza cerebral en nuestro modelo *in vivo* de cicatriz glial. Recientemente, Rubovitch y colaboradores han demostrado que el Salubrinal es neuroprotector y mejora la ejecución de la tarea en test comportamentales de ratones con lesión traumática cerebral respecto a ratones lesionados sin tratamiento (Rubovitch et al., 2015). Nosotros proponemos que este efecto neuroprotector puede deberse a que el Salubrinal actúa directamente sobre las neuronas. Lu y colaboradores demostraron que la reducción de la síntesis de proteínas en el RE produce una disminución en el consumo metabólico, lo que aumenta la supervivencia celular en condiciones adversas (Lu et al., 2004). Por ello en este estudio proponemos que el Salubrinal podría actuar directamente sobre las neuronas al reducir la transcripción y traducción de proteínas no necesarias para la supervivencia celular y, por ello, tener un efecto neuroprotector tras una lesión en el SNC.

4. El efecto del Salubrinal sobre la reactividad glial y la producción de fibronectina varía dependiendo del tiempo de administración postlesión

La respuesta del SNC tras el daño es un proceso multicelular que está en continuo cambio a lo largo del tiempo postlesión, y que está regulada por una multitud de moléculas intra y extracelulares (Burda and Sofroniew, 2014). Después de producirse una lesión, la glía (astrocitos y microglía) presente en la zona lesionada pasa a estado reactivo. Además, las células mesenquimales aumentan la secreción de fibronectina. Todo ello contribuye a la formación de la cicatriz glial. Dependiendo del tiempo y del microambiente de la zona lesionada tras el daño, toda esta respuesta puede tener efectos beneficiosos o perjudiciales en el tejido nervioso (Lo, 2008). Por ello, utilizando nuestro modelo *in vivo* de lesión lacerante evaluamos la reactividad glial y la expresión de fibronectina.

Durante la fase aguda, las células residentes del SNC (en especial los astrocitos y la microglía) proliferan y migran hacia la zona lesionada. Además, evolucionan hacia un fenotipo reactivo, engrosando sus prolongaciones (Loane and Byrnes, 2010; Pekny and Pekna, 2014). Por otra parte, a consecuencia de la lesión se produce una ruptura de la BHE y las células mesenquimales (como fibroblastos meníngeos, fibroblastos perivasculares y pericitos) que forman parte de la *glia limitans* segregan fibronectina en la zona de lesión. En los ratones lesionados y sacrificados en la fase aguda de la lesión (a los 3 días tras la lesión) observamos un aumento de la reactividad glial, tanto astrocitaria como microglial, y un aumento en la expresión de fibronectina en los animales lesionados (Figuras 19 B y 20 C). El tratamiento con Sal003 en los animales lesionados no produjo cambios en la reactividad de los astrocitos y aumentó ligeramente los niveles de Iba1, sin ser ese aumento estadísticamente significativo respecto de los animales lesionados sin tratar. Además, el Salubrinal aumentó levemente los valores de inmunorreactividad frente a fibronectina, por lo que no parece que afecte a la expresión de fibronectina por parte de las células mesenquimales en animales sacrificados a los 3 dpl.

Como acabamos de comentar, el tratamiento agudo con Salubrinal aumentó levemente la expresión de Iba1 en los animales sacrificados a los 3dpl, aunque dicho aumento no es significativo. Sin embargo, los niveles de inmunorreactividad de inmunoglobulinas IgG de la sangre no variaron (Figura 29), ni cambió la expresión de los marcadores inflamatorios CD16/CD32 y arginasa 1 (Figura 29). Por otro lado, en los experimentos realizados en cultivos de microglía, el Salubrinal no afectó ni a la viabilidad (Figura 27), ni a la activación microglial, medida a través de la actividad de la enzima iNOS (Figura 28). Todo ello corrobora que el Salubrinal en etapas tempranas tras la lesión no afecta al paso de moléculas

de la sangre al tejido nervioso, ni a la extravasación de monocitos/macrófagos, y tampoco polariza la población microglía/macrófagos hacia un fenotipo M1 o proinflamatorio (marcaje CD16/CD32), o hacia uno M2 o antiinflamatorio (marcaje arginasa 1), por lo que no produce, *a priori*, cambios directos en la activación microglial/monocito sanguíneo.

Una vez realizado el experimento a los 3 dpl y, debido a que hasta los 21 días tras la lesión no se establece una cicatriz glial madura, realizamos un estudio similar en la fase de consolidación de la cicatriz, sacrificando a los animales a los 21 dpl. El tratamiento con Salubrinal se realizó en el primero de los estudios de forma aguda (con tratamiento diario, durante los 3 primeros días tras la lesión), y en el segundo estudio mediante un tratamiento crónico (con una inyección cada 48 horas, a partir del día 8 hasta el día anterior al sacrificio), y comparamos sus efectos sobre la reactividad glial y la expresión de fibronectina. En el tratamiento agudo con Salubrinal, la inmunorreactividad para GFAP no se vio afectada, la de Iba1 disminuyó muy significativamente, mientras que la de fibronectina aumentó muy significativamente (Figura 21). Sin embargo, en el tratamiento crónico, aumentó significativamente la expresión de GFAP, aumentó levemente la de Iba1, y la de fibronectina no cambió con respecto a los animales lesionados (Figura 23).

Para conocer las causas de estos cambios en la reactividad astrogial cuantificamos los niveles de ciertas moléculas proinflamatorias. El Salubrinal aumentó la actividad transcripcional (Figura 25) y la secreción de citoquinas proinflamatorias en cultivos de astrocitos (Figura 26). Esta producción de moléculas proinflamatorias por parte de los astrocitos podría ser la causa de que en el tratamiento crónico con Salubrinal aumente la expresión de GFAP con respecto a los animales lesionados, ya que dichas moléculas promueven la reactividad astrocitaria tras el daño (Van Wagoner and Benveniste, 1999; John et al., 2004). Pero muchas de las citoquinas proinflamatorias inducidas por el Salubrinal en los astrocitos activan también la reactividad microglial en los animales lesionados y no observamos que esto ocurra. Además, en los cultivos de astrocitos también observamos un aumento en la secreción del factor proangiogénico VEGF. El aumento de VEGF está involucrado en la patogénesis de la atrogliosis, ya que los astrocitos tienen receptor para VEGF. Así, este mecanismo autocrino aumenta la proliferación de los astrocitos (Koyama et al., 2012). Este aumento no se produce en el tratamiento agudo con Salubrinal porque los astrocitos alcanzan su pico de reactividad a los 7 días tras la lesión (Logan and Berry, 2002). Además, a partir de los 4 - 5 días tras la lesión, los precursores O2A migran hacia la zona lesionada procedentes de la corriente migratoria rostral (Logan and Berry, 2002). Estos precursores se diferencian hacia oligodendrocitos o hacia células astrogiales tipo 2 (Raff et al., 1983). Por ello, el tratamiento crónico con Salubrinal también podría favorecer la diferenciación de precursores O2A hacia astrocitos en la zona de lesión, que al tornarse reactivos, provocan un aumento en

la expresión de GFAP. Este aumento no se observó en el tratamiento agudo con Salubrinal, porque la migración de las células O2A hacia la lesión no se produce hasta la fase subaguda tras la lesión, que es posterior a los 3 dpl. Así, su efecto puede deberse a un aumento en la reactividad astrogliar provocada por mediadores inflamatorios o a una polarización de la diferenciación de O2A hacia células astrogliales.

El tratamiento agudo con Salubrinal en nuestro modelo *in vivo* no tuvo ningún efecto sobre la inmunorreactividad frente al proteoglicano neurocán, tanto en animales sacrificados a los 3 dpl (Figura 20), como a los 21 dpl (Figura 22). Este resultado no coincide con los resultados obtenidos en los experimentos realizados *in vitro*, donde el tratamiento con Salubrinal disminuía la transcripción y traducción de proteoglicanos. El resultado puede deberse a la gran variabilidad en la inmunorreactividad frente a neurocán que observamos entre los diferentes animales. No hemos encontrado ningún otro anticuerpo contra CSPGs que proporcione un marcaje limpio y claro en tejido de ratón. Por otro lado, el tratamiento agudo con Salubrinal mantuvo los niveles de expresión de GFAP iguales a los animales lesionados no tratados, tanto a 3 como a 21 dpl, sugiriendo que la reactividad astrogliar no se ve afectada por el Salubrinal. Los astrocitos son el principal tipo celular responsable de la expresión y secreción de proteoglicanos (Zimmermann and Dours-Zimmermann, 2008), incluido el neurocán, que está regulado por el microambiente inflamatorio (Sajad et al., 2011). Estos resultados sugieren que, al igual que el Salubrinal no afecta aparentemente a la reactividad astrogliar en los animales lesionados respecto a los lesionados sin tratar, tampoco se ve afectada la expresión de neurocán cuando realizamos un tratamiento agudo.

En los animales sacrificados a los 21 dpl, el tratamiento agudo con Salubrinal causó una disminución muy significativa de la reactividad microglial respecto de los animales lesionados sin tratar, mientras que la expresión de fibronectina aumentó muy significativamente. Komuta y colaboradores demostraron que, en un modelo de lesión cerebral en ratones, a los 3 dpl la expresión de fibronectina en la zona lesionada es casi inexistente, incrementándose a partir del 5º día (Komuta et al., 2010). Este aumento de fibronectina corresponde con el aumento de células mesenquimales alrededor de la lesión, que se integran en la cicatriz, cuya estructura queda totalmente formada a los 14 dpl. Por ello, en nuestro modelo de lesión el aumento significativo en la expresión de fibronectina causado por el Salubrinal se observó en los animales sacrificados en la fase de consolidación. Nosotros proponemos que, en nuestro modelo de lesión *in vivo*, el tratamiento agudo con Salubrinal induce la expresión de fibronectina por las células mesenquimales, lo que podría favorecer la consolidación y cierre de la cicatriz, impidiendo el paso moléculas inflamatorias de los vasos sanguíneos al tejido nervioso y, por lo tanto, disminuyendo la reactividad microglial.

Sin embargo, el tratamiento crónico con Salubrinal no afectó a la expresión de fibronectina y aumentó muy poco la reactividad microglial. Así que proponemos que el efecto del Salubrinal sobre la consolidación y el cierre de la cicatriz no sólo se debe a su efecto sobre las células mesenquimales, sino que debe existir algún mediador que provoque el aumento en la expresión de fibronectina.

5. El Salubrinal modula la permeabilidad de la BHE en un modelo de cicatriz glial

El tratamiento agudo con Salubrinal aumentó significativamente la expresión de fibronectina en los animales sacrificados a los 21 dpl con respecto a los animales lesionados control. Dada la importancia que tiene la ruta del TGF β en la fibrosis en general y en la formación de la cicatriz en particular (Lagord et al., 2002), estudiamos la activación de esta ruta en nuestro modelo de lesión, utilizando ratones transgénicos SBE-luc, a los que realizamos una lesión mecánica y les administramos Salubrinal. La medida de bioluminiscencia de cada uno de los animales es proporcional a la activación de la ruta de TGF β . Doyle y colaboradores han demostrado que la señal bioluminiscente y, por tanto, los niveles de activación de la ruta de TGF β no varían entre machos y hembras, ya que no fluctúan con el ciclo estrogénico (Doyle et al., 2010). Por ello, en este experimento utilizamos indistintamente ratones machos o hembras. En estudios anteriores, en un modelo de lesión por oclusión de la arteria cerebral de ratones, se comprobó que la señal bioluminiscente se incrementa 2 veces tras la lesión y que dicho incremento comienza 1 dpl y tiene un máximo de inducción a los 7 dpl (Doyle et al., 2010). En nuestro modelo de lesión lacerante en ratones, el incremento de bioluminiscencia con respecto a la basal en los animales lesionados comenzó inmediatamente tras la lesión y se extiende hasta los 7 dpl, tiempo en el que disminuyó drásticamente hasta los 21 dpl (Figura 24). Este tiempo coincide con el establecimiento y consolidación de la cicatriz. Además, el incremento en los animales lesionados fue de hasta 5 veces con respecto a la bioluminiscencia basal, lo que demuestra la implicación de la ruta del TGF β en el desarrollo y formación de la cicatriz glial (Schachtrup et al., 2010). Los ratones lesionados que fueron tratados con Salubrinal no muestran diferencias de bioluminiscencia con respecto a los animales lesionados (Figura 24). Por ello, el tratamiento agudo con Salubrinal no afecta a la ruta de activación de TGF β en nuestro modelo de cicatriz glial *in vivo* y, por tanto, no parece estar implicado en el aumento en la expresión de fibronectina.

Una de las posibles causas del aumento de la inmunorreactividad para fibronectina puede ser la inducción por PDGF, ya que dicho factor de crecimiento estimula su producción y secreción (Kischer and Pindur, 1990; Albrecht and Tidball, 1997; Kim et al., 2005; Park et al., 2005). Además, tiene un papel importante en el proceso profibrótico en general

(Trojanowska, 2008) y en la formación de la cicatriz en particular (Cregg et al., 2014). Por ello, evaluamos los niveles de expresión de PDGF-B en ratones lesionados con tratamiento agudo de Salubrinal y sacrificados a los 3 dpl, y vimos que el Salubrinal aumentó significativamente la expresión de PDGF-B (Figura 30). El Salubrinal es una droga que mantiene al factor eIF2 α en su estado fosforilado, reduciendo la síntesis de proteínas en el RER. En este estudio hemos demostrado que el Salubrinal reduce la transcripción y traducción de proteoglicanos y proteínas profibróticas en cultivos de astrocitos. Sin embargo, en nuestro modelo *in vivo* aumenta los niveles de PDGF-B. La expresión de PDGF se debe a la codificación del gen *c-sis*, que es capaz de saltarse la reducción de la transcripción general de las proteínas sintetizadas en el RE debido al aumento de la fosforilación de eIF2 α (Barrett et al., 1984; Liu et al., 2001). Por ello, aunque el Salubrinal es una droga que modula la síntesis de proteínas en el RER, también es capaz de aumentar los niveles de PDGF-B tras una lesión en la corteza cerebral murina.

El PDGF-B puede ser producido por muchos tipos celulares, alguno de los cuales están presentes en el tejido cerebral lesionado o en los componentes de la cicatriz glial (Heldin and Westermark, 1999). Por ello, estudiamos las células responsables del aumento en la expresión de PDGF-B tras la lesión mediante comarques con el anticuerpo anti-PDGF-B y con marcadores de neuronas (anti-NeuN), astrocitos (anti-GFAP) y microglía (anti-Iba1). Las células endoteliales son grandes productoras de PDGF-B (Battegay et al., 1994). Aunque realizamos comarques con el anticuerpo anti-PDGF-B y con el anticuerpo anti-CD31 (marcador específico de células endoteliales), no obtuvimos resultados satisfactorios. Sin embargo, en nuestro estudio observamos que la mayoría de las células (85% aproximadamente) que presentaban inmunorreactividad frente a PDGF-B en la zona lesionada eran inmunorreactivas para NeuN y, por tanto, eran neuronas (Figura 31). La depleción de PDGF-B en neuronas en un modelo transgénico de ratón no afecta a la reactividad glial tras una lesión (Enge et al., 2003). Sin embargo, el PDGF-B es necesario para el reclutamiento de pericitos en los vasos sanguíneos (Abramsson et al., 2003; Lindblom et al., 2003) y su activación para formar la BHE (Bergers and Song, 2005). Tanto los fibroblastos (meníngeos y perivasculares) como los pericitos expresan en su membrana el receptor para PDGF-B (PDGFR-B) (Sundberg et al., 1993; Heldin et al., 1998). Por ello, aunque no pudimos caracterizar la expresión de PDGFR-B en los diferentes tipos celulares en nuestro modelo de lesión debido a que el anticuerpo no funcionó satisfactoriamente, proponemos que la producción de PDGF-B por parte de las neuronas puede contribuir a la formación de la cicatriz glial gracias al reclutamiento de las células mesenquimales (fibroblastos meníngeos, fibroblastos perivasculares y pericitos) y a la estimulación de la producción de fibronectina por estas células.

El tratamiento con Salubrinal contribuye a la cicatriz glial y una de sus funciones

es impedir el elevado paso de sustancias del torrente sanguíneo al parénquima nervioso. Además, Shen y colaboradores han demostrado en un modelo de isquemia de ratones que el PDGF colabora para que los astrocitos y los fibroblastos cierren la BHE, contribuyendo así a la neuroprotección (Shen et al., 2012). Por ello, en este estudio evaluamos si el Salubrinal era capaz de impedir la extravasación al parénquima nervioso. Utilizamos ratones lesionados y sacrificados a los 14 dpl, tiempo en el que la cicatriz ya está bien formada. El tratamiento agudo con Salubrinal disminuyó significativamente la extravasación causada por la lesión, por lo que redujo la permeabilidad de la BHE (Figura 32). Esto concuerda con la disminución observada en la expresión de Iba1 y el aumento en la expresión de fibronectina en los animales con tratamiento agudo de Salubrinal y sacrificados a los 21 dpl. Además, Lin y colaboradores han demostrado que inyecciones de fibronectina en animales con lesión medular crónica reducen significativamente la respuesta inflamatoria (Lin et al., 2012). Por todo ello, proponemos que el Salubrinal aumenta los niveles de PDGF-B, que actúa sobre las células mesenquimales aumentando los niveles de expresión de fibronectina, lo que contribuye a la formación de la cicatriz. La cicatriz reduce la extravasación de moléculas y células del torrente sanguíneo al cerebro, lo que disminuye la inflamación en el parénquima nervioso y también la reactividad microglial/monocito sanguíneo.

Cuando se produce una lesión en el SNC se inicia una cascada inflamatoria en respuesta al daño producido. En general, la inflamación tiene efectos beneficiosos o negativos dependiendo de su duración tras la lesión (Brown and Neher, 2010). Inicialmente contribuye a la eliminación de las células muertas y sustancias tóxicas. Sin embargo, si se alarga en el tiempo y se cronifica puede llegar a ser nociva para el tejido nervioso, contribuyendo al daño neuronal secundario (Kim and de Vellis, 2005). Así, la entrada de moléculas y células inflamatorias al tejido nervioso debido a la ruptura de la BHE puede llevar a una respuesta inmune crónica y descontrolada, que puede derivar en muerte celular masiva, traducida en déficits funcionales. Schachtrup y colaboradores han demostrado que la BHE lesionada permite el paso del fibrinógeno de la sangre al parénquima neural, contribuyendo a la inhibición del crecimiento neurítico (Schachtrup et al., 2007). Además, la entrada del contenido sanguíneo al parénquima neural induce muerte neuronal y activa a la microglía, que también contribuye a la muerte neuronal secundaria (Hausmann, 2003; Lotocki et al., 2009; Stoica and Faden, 2010). Proponemos que el tratamiento agudo con Salubrinal podría tener un efecto neuroprotector adicional indirecto favoreciendo la maduración de la cicatriz (ya que reduce la extravasación de sustancias sanguíneas) y disminuyendo la muerte neuronal secundaria al reducir la reactividad microglial a los 21 dpl.

6. Efecto global del Salubrinal sobre la formación de la cicatriz glial tras una lesión en el SNC

Como hemos demostrado en este estudio, el tratamiento agudo con Salubrinal provoca un aumento en la supervivencia neuronal a corto plazo tras una lesión. Zheng y colaboradores han demostrado que el PDGF tiene efectos neuroprotectores frente al estrés oxidativo (Zheng et al., 2010) y el tratamiento con Salubrinal aumenta la expresión de PDGF-B en las neuronas cercanas a la zona lesionada. Este aumento en la expresión del factor de crecimiento PDGF-B, causa un incremento en la expresión de fibronectina en las células mesenquimales, lo que contribuye a la formación de la cicatriz glial. Esta cicatriz impide la elevada extravasación de moléculas y células procedentes del torrente sanguíneo al cerebro, lo que disminuye la inflamación en el tejido nervioso, favoreciendo la supervivencia neuronal en la zona adyacente a la lesión a largo plazo.

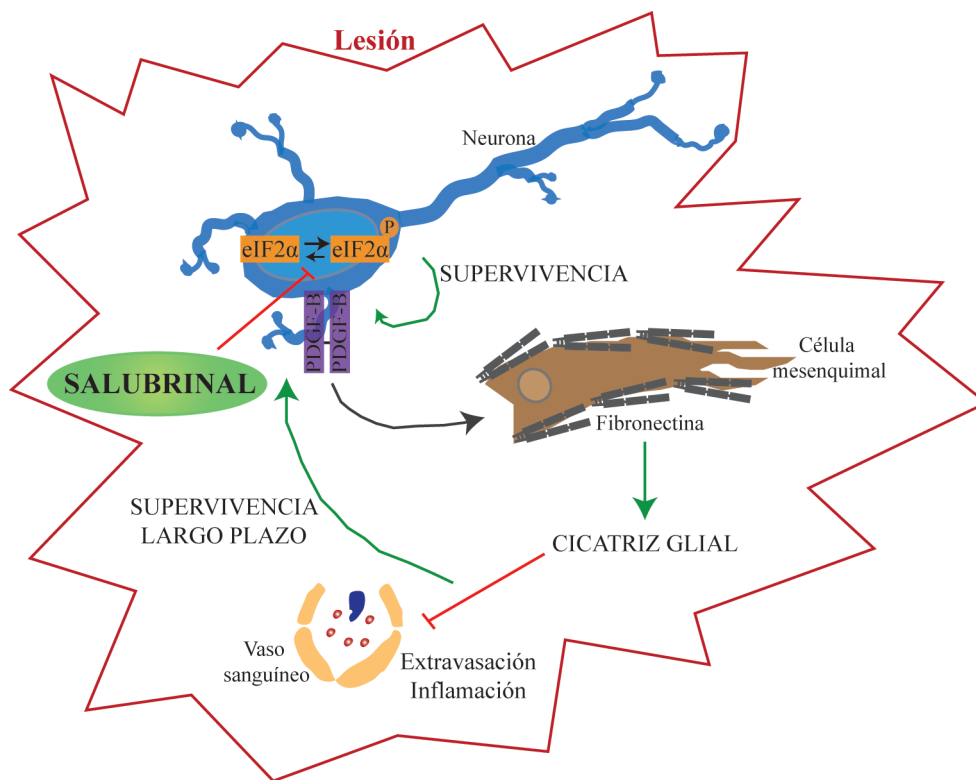


Figura 33: Esquema representativo del efecto global del Salubrinal sobre la formación de la cicatriz glial tras una lesión en el SNC. Tras producirse una lesión, el tratamiento agudo con Salubrinal promueve la supervivencia neuronal a corto plazo al reducir la transcripción y traducción de proteínas no necesarias

para la supervivencia celular. Dichas neuronas próximas a la zona lesionada expresan PDGF-B, que causa un incremento en la expresión de fibronectina, lo que contribuye a la formación de la cicatriz glial. Esta cicatriz impide la extravasación masiva de moléculas y células procedentes del torrente sanguíneo al cerebro, lo que disminuye la inflamación en el tejido nervioso, favoreciendo la supervivencia neuronal en la zona adyacente a la lesión a largo plazo.

Sin embargo, el tratamiento crónico con Salubrinal ni aumenta la fibronectina, ni reduce la reactividad microglial, por lo que no muestra efectos beneficiosos en la fase de consolidación de la cicatriz. Esto puede deberse a que si el tratamiento se realiza a partir de los 8 días tras la lesión, la supervivencia de las neuronas presentes en la zona lesionada no mejora y las neuronas dañadas mueren. Tampoco aumenta la producción de PDGF-B, y por tanto, no se incrementa la expresión de la fibronectina, que contribuye al cierre de la cicatriz y la reducción de la extravasación. Además, el tratamiento con Salubrinal en la fase de consolidación de la cicatriz glial podría impedir su maduración, inhibiendo la diferenciación de astrocitos y fibroblastos y favoreciendo, por tanto, el paso de sustancias de la sangre y leucocitos.

Por todos estos resultados, demostramos que el efecto del Salubrinal en un modelo animal de lesión lacerante varía según el momento de su administración tras la lesión. La reactividad glial inducida tras una lesión tiene efectos antagónicos. Por una parte, las células que forman la cicatriz glial secretan al medio sustancias inhibitoras para la regeneración (McKeon et al., 1991; Giger et al., 2010), pero también la cicatriz formada impide el paso de leucocitos y moléculas del torrente sanguíneo al parénquima nervioso, impidiendo la cronicación de la inflamación dañina para el tejido (Faulkner et al., 2004). Por eso, es importante la existencia y el control de la cicatriz, ya que, según el tiempo que haya transcurrido desde la lesión, provoca beneficios o detrimentos sobre el tejido nervioso, y su balance será esencial para la recuperación funcional (Burda and Sofroniew, 2014; Liu et al., 2014; Pekny and Pekna, 2014). Aunque el tratamiento agudo con Salubrinal induce la formación de la cicatriz, también impide la extravasación sanguínea incontrolada, tan dañina para el parénquima nervioso. Por ello, habría que plantearse si el efecto perjudicial de la fibrosis ocasionada inicialmente es compensable con la disminución de la inflamación y con el aumento de la supervivencia neuronal.

De todas maneras, el tratamiento con Salubrinal al inicio de la lesión podría ser el primero de una serie de tratamientos con diferentes fármacos. El Salubrinal induciría neuroprotección y favorecería el cierre de la cicatriz glial para, más adelante, una vez encontrada la ventana óptima de tratamiento, tratar con otro fármaco que promueva la regeneración axonal.

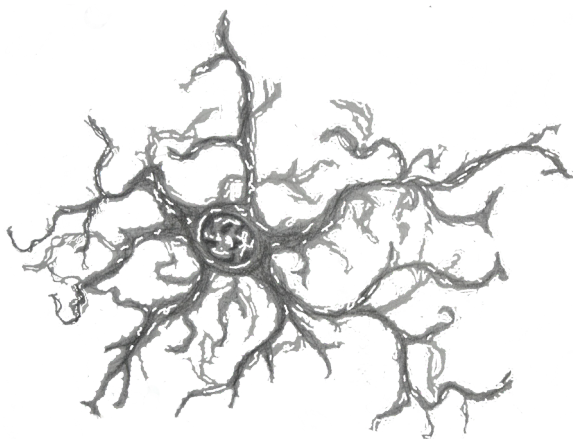
A pesar de que está ampliamente aceptado por la comunidad científica que “a mayor fibrosis en el SNC, menor regeneración axonal”, desconocemos si los animales lesionados y tratados con Salubrinal podrían tener un mayor crecimiento axonal. Actualmente, este aspecto está siendo objeto de estudio.

En este trabajo instamos a considerar el uso del Salubrinal como herramienta terapéutica moduladora de la formación de la cicatriz glial. Dependiendo de la fase en la formación de la cicatriz en la que se administre, el Salubrinal tendrá efectos beneficiosos que permitan la recuperación funcional.



Conclusiones

1. El Salubrinal reduce la transcripción y traducción de proteoglicanos y proteínas profibróticas inducidos por los factores de crecimiento TGF β y EGF en cultivos de astrocitos.
2. El tratamiento con Salubrinal favorece el crecimiento neurítico de neuronas corticales en un modelo de cicatriz glial *in vitro*.
3. El tratamiento agudo con Salubrinal tiene un efecto neuroprotector en un modelo de lesión lacerante en corteza cerebral murina.
4. El tratamiento agudo con Salubrinal aumenta los niveles de expresión de fibronectina y disminuye la reactividad microglial en la fase de consolidación de la cicatriz en un modelo de lesión lacerante en la corteza cerebral murina. Estos efectos no se deben a que el Salubrinal afecte a la activación de la ruta del factor de crecimiento TGF β .
5. El Salubrinal provoca un aumento en la expresión de PDGF-B en las neuronas cercanas a la zona de lesión, lo que causa un incremento en la fibronectina, contribuyendo a la formación de la cicatriz glial. Dicha cicatriz impide la elevada extravasación de moléculas y células procedentes del torrente sanguíneo, lo que disminuye la inflamación en el tejido nervioso. Todo ello favorece la supervivencia neuronal a largo plazo en la zona adyacente a la lesión.
6. Dependiendo del marco temporal de administración tras la lesión, el Salubrinal podría ser una herramienta terapéutica beneficiosa en lesiones mecánicas del SNC, modulando la formación de la cicatriz glial y posibilitando la recuperación funcional tras el daño.



Bibliografia

- Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C (2003) Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *The Journal of clinical investigation* 112:1142-1151.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience* 10:1538-1543.
- Albrecht DE, Tidball JG (1997) Platelet-derived growth factor-stimulated secretion of basement membrane proteins by skeletal muscle occurs by tyrosine kinase-dependent and -independent pathways. *The Journal of biological chemistry* 272:2236-2244.
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457:675-677.
- Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE (2006) Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clinic proceedings* 81:1241-1257.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annual review of physiology* 63:795-813.
- Asher RA, Morgenstern DA, Moon LD, Fawcett JW (2001) Chondroitin sulphate proteoglycans: inhibitory components of the glial scar. *Progress in brain research* 132:611-619.
- Asher RA, Morgenstern DA, Fidler PS, Adcock KH, Oohira A, Braistead JE, Levine JM, Margolis RU, Rogers JH, Fawcett JW (2000) Neurocan is upregulated in injured brain and in cytokine-treated astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2427-2438.
- Bareyre FM, Schwab ME (2003) Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays. *Trends in neurosciences* 26:555-563.
- Barnabe-Heider F, Goritz C, Sabelstrom H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisen J (2010) Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell stem cell* 7:470-482.

- Barrett TB, Gajdusek CM, Schwartz SM, McDougall JK, Benditt EP (1984) Expression of the sis gene by endothelial cells in culture and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:6772-6774.
- Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L, Sage EH, Pech M (1994) PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF beta-receptors. *The Journal of cell biology* 125:917-928.
- Beller JA, Snow DM (2014) Proteoglycans: road signs for neurite outgrowth. *Neural regeneration research* 9:343-355.
- Bergers G, Song S (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 7:452-464.
- Berry M, Maxwell WL, Logan A, Mathewson A, McConnell P, Ashhurst DE, Thomas GH (1983) Deposition of scar tissue in the central nervous system. *Acta neurochirurgica Supplementum* 32:31-53.
- Bovolenta P, Wandosell F, Nieto-Sampedro M (1992) CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Progress in brain research* 94:367-379.
- Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J (2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 307:935-939.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
- Brown GC, Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Molecular neurobiology* 41:242-247.
- Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81:229-248.
- Chen G, Ma C, Bower KA, Ke Z, Luo J (2006) Interaction between RAX and PKR modulates the effect of ethanol on protein synthesis and survival of neurons. *The Journal of*

biological chemistry 281:15909-15915.

- Conrad S, Schluesener HJ, Adibzadeh M, Schwab JM (2005) Spinal cord injury induction of lesional expression of profibrotic and angiogenic connective tissue growth factor confined to reactive astrocytes, invading fibroblasts and endothelial cells. *Journal of neurosurgery Spine* 2:319-326.
- Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J (2014) Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology* 253:197-207.
- Cui W, Akhurst RJ (1996) Transforming growth factor β S: Biochemistry and biological activities in vitro and in vivo. In: *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease* (Derek L, Carolyn B, eds), pp 319-356: JAI.
- David S, Kroner A (2011) Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nature reviews Neuroscience* 12:388-399.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO journal* 17:3091-3100.
- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
- Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA (2000) Pericyte Migration from the Vascular Wall in Response to Traumatic Brain Injury. *Microvascular Research* 60:55-69.
- Doyle KP, Cekanaviciute E, Mamer LE, Buckwalter MS (2010) TGFbeta signaling in the brain increases with aging and signals to astrocytes and innate immune cells in the weeks after stroke. *Journal of neuroinflammation* 7:62.
- Dubois A, Benavides J, Peny B, Duverger D, Fage D, Gotti B, MacKenzie ET, Scatton B (1988) Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat and cat. *Brain research* 445:77-90.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.

- Enge M, Wilhelmsson U, Abramsson A, Stakeberg J, Kuhn R, Betsholtz C, Pekny M (2003) Neuron-specific ablation of PDGF-B is compatible with normal central nervous system development and astroglial response to injury. *Neurochem Res* 28:271-279.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2143-2155.
- Fawcett J (2009) Molecular control of brain plasticity and repair. *Progress in brain research* 175:501-509.
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin* 49:377-391.
- Fedoroff S, Richardson A (2001) *Protocols for neural cell culture*: Springer.
- Fernaud-Espinosa I, Nieto-Sampedro M, Bovolenta P (1993) Differential activation of microglia and astrocytes in aniso- and isomorphic gliotic tissue. *Glia* 8:277-291.
- Fitch MT, Silver J (2008) CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental neurology* 209:294-301.
- Franco SJ, Muller U (2011) Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. *Developmental neurobiology* 71:889-900.
- Galtrey CM, Fawcett JW (2007) The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain research reviews* 54:1-18.
- Gao Z, Zhu Q, Zhang Y, Zhao Y, Cai L, Shields CB, Cai J (2013) Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Molecular neurobiology* 48:690-701.
- Giger RJ, Edmund R, Hollis I, Tuszynski MH (2010) Guidance Molecules in Axon Regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(7).
- Gittins R, Harrison PJ (2004) Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain research bulletin*

63:155-160.

- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience* 22:219-240.

- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature reviews Immunology* 3:23-35.

- Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J (2011) A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 333:238-242.

- Gris P, Tighe A, Levin D, Sharma R, Brown A (2007) Transcriptional regulation of scar gene expression in primary astrocytes. *Glia* 55:1145-1155.

- Gundersen H, Bendtsen T, KORBO L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard J, Pakkenberg B, Sørensen F, Vesterby A (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 96:379-394.

- Hamel MG, Mayer J, Gottschall PE (2005) Altered production and proteolytic processing of brevican by transforming growth factor beta in cultured astrocytes. *Journal of neurochemistry* 93:1533-1541.

- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 10:1387-1394.

- Hartmann U, Maurer P (2001) Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 20:23-35.

- Hausmann ON (2003) Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal cord* 41:369-378.

- Hayashi N, Tatsumi K, Okuda H, Yoshikawa M, Ishizaka S, Miyata S, Manabe T, Wanaka A (2007) DACS, novel matrix structure composed of chondroitin sulfate proteoglycan in the brain. *Biochemical and biophysical research communications* 364:410-415.

- Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et biophysica acta* 1378:F79-113.

- Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79:1283-1316.
- Hertel M, Tretter Y, Alzheimer C, Werner S (2000) Connective tissue growth factor: a novel player in tissue reorganization after brain injury? *The European journal of neuroscience* 12:376-380.
- Hu R, Zhou J, Luo C, Lin J, Wang X, Li X, Bian X, Li Y, Wan Q, Yu Y, Feng H (2010) Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. *Journal of neurosurgery Spine* 13:169-180.
- Huang X, Chen Y, Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H (2012) Salubrinal attenuates beta-amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF-kappaB pathway. *Neurobiol Aging* 33:1007 e1009-1017.
- John GR, Chen L, Rivieccio MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF (2004) Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2837-2845.
- John GR, Lee SC, Song X, Rivieccio M, Brosnan CF (2005) IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49:161-176.
- Kalman M, Szabo A (2000) Plectin immunopositivity appears in the astrocytes in the white matter but not in the gray matter after stab wounds. *Brain research* 857:291-294.
- Kearns AE, Vertel BM, Schwartz NB (1993) Topography of glycosylation and UDP-xylose production. *The Journal of biological chemistry* 268:11097-11104.
- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009) Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29:13435-13444.
- Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *Journal of neuroscience research* 81:302-313.
- Kimura-Kuroda J, Teng X, Komuta Y, Yoshioka N, Sango K, Kawamura K, Rais-

man G, Kawano H (2010) An in vitro model of the inhibition of axon growth in the lesion scar formed after central nervous system injury. *Molecular and cellular neurosciences* 43:177-187.

- Kischer CW, Pindur J (1990) Effects of platelet derived growth factor (PDGF) on fibronectin (FN) production by human skin and scar fibroblasts. *Cytotechnology* 3:231-238.

- Kitagawa H, Izumikawa T, Uyama T, Sugahara K (2003) Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization. *The Journal of biological chemistry* 278:23666-23671.

- Klausmeyer A, Conrad R, Faissner A, Wiese S (2011) Influence of glial-derived matrix molecules, especially chondroitin sulfates, on neurite growth and survival of cultured mouse embryonic motoneurons. *Journal of neuroscience research* 89:127-141.

- Komuta Y, Teng X, Yanagisawa H, Sango K, Kawamura K, Kawano H (2010) Expression of transforming growth factor-beta receptors in meningeal fibroblasts of the injured mouse brain. *Cellular and molecular neurobiology* 30:101-111.

- Koyama Y, Maebara Y, Hayashi M, Nagae R, Tokuyama S, Michinaga S (2012) Endothelins reciprocally regulate VEGF-A and angiopoietin-1 production in cultured rat astrocytes: implications on astrocytic proliferation. *Glia* 60:1954-1963.

- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19:312-318.

- Kwok JC, Carulli D, Fawcett JW (2010) In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of neurochemistry* 114:1447-1459.

- Kwok JC, Afshari F, Garcia-Alias G, Fawcett JW (2008) Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restorative neurology and neuroscience* 26:131-145.

- Kwok JC, Dick G, Wang D, Fawcett JW (2011) Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Developmental neurobiology* 71:1073-1089.

- Laabs TL, Wang H, Katagiri Y, McCann T, Fawcett JW, Geller HM (2007) Inhibi-

ting glycosaminoglycan chain polymerization decreases the inhibitory activity of astrocyte-derived chondroitin sulfate proteoglycans. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:14494-14501.

- Lagord C, Berry M, Logan A (2002) Expression of TGF β 2 but Not TGF β 1 Correlates with the Deposition of Scar Tissue in the Lesioned Spinal Cord. *Molecular and Cellular Neuroscience* 20:69-92.

- Lewerenz J, Maher P (2009) Basal levels of eIF2 α phosphorylation determine cellular antioxidant status by regulating ATF4 and xCT expression. *The Journal of biological chemistry* 284:1106-1115.

- Lin AH, Luo J, Mondschein LH, ten Dijke P, Vivien D, Contag CH, Wyss-Coray T (2005) Global analysis of Smad2/3-dependent TGF-beta signaling in living mice reveals prominent tissue-specific responses to injury. *Journal of immunology* 175:547-554.

- Lin W, Kunkler PE, Harding HP, Ron D, Kraig RP, Popko B (2008) Enhanced integrated stress response promotes myelinating oligodendrocyte survival in response to interferon-gamma. *Am J Pathol* 173:1508-1517.

- Lin CY, Lee YS, Lin VW, Silver J (2012) Fibronectin inhibits chronic pain development after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 29:589-599.

- Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellstrom M, Backstrom G, Fredriksson S, Landegren U, Nystrom HC, Bergstrom G, Dejana E, Ostman A, Lindahl P, Betsholtz C (2003) Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev* 17:1835-1840.

- Liu J, Xu R, Jin Y, Wang D (2001) Triplex targeting of human PDGF-B (c-sis, proto-oncogene) promoter specifically inhibits factors binding and PDGF-B transcription. *Nucleic Acids Res* 29:783-791.

- Liu BP, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM (2006) Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 361:1593-1610.

- Liu CL, Li X, Hu GL, Li RJ, He YY, Zhong W, Li S, He KL, Wang LL (2012) Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via

the PERK-eIF2alpha signaling pathway. *Journal of geriatric cardiology* : JGC 9:258-268.

- Liu Z, Li Y, Cui Y, Roberts C, Lu M, Wilhelmsson U, Pekny M, Chopp M (2014) Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia* 62:2022-2033.

- Lo EH (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nature medicine* 14:497-500.

- Loane DJ, Byrnes KR (2010) Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* 7:366-377.

- Logan A, Berry M (2002) Cellular and molecular determinants of glial scar formation. *Advances in experimental medicine and biology* 513:115-158.

- Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Perez ER, Sanchez-Molano J, Furones-Alonso O, Bramlett HM, Dietrich WD (2009) Alterations in Blood-Brain Barrier Permeability to Large and Small Molecules and Leukocyte Accumulation after Traumatic Brain Injury: Effects of Post-Traumatic Hypothermia. *Journal of neurotrauma* 26:1123-1134.

- Lu L, Han AP, Chen JJ (2001) Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Molecular and cellular biology* 21:7971-7980.

- Lu PD, Jousse C, Marciniak SJ, Zhang Y, Novoa I, Scheuner D, Kaufman RJ, Ron D, Harding HP (2004) Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *The EMBO journal* 23:169-179.

- Luo J, Lin AH, Masliah E, Wyss-Coray T (2006) Bioluminescence imaging of Smad signaling in living mice shows correlation with excitotoxic neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:18326-18331.

- Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA (1999) Extracellular matrix degradation by metalloproteinases and central nervous system diseases. *Molecular neurobiology* 19:267-284.

- Lynes EM, Simmen T (2011) Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER):

how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochimica et biophysica acta* 1813:1893-1905.

- McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *The Journal of cell biology* 85:890-902.

- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 11:3398-3411.

- Makower AM, Wroblewski J, Pawlowski A (1988) Effects of IGF-I, EGF, and FGF on proteoglycans synthesized by fractionated chondrocytes of rat rib growth plate. *Exp Cell Res* 179:498-506.

- Malhotra SK, Shnitka TK (1994) Adaptive plasticity and diversity among reactive astrocytes in central nervous system lesions. *Biomed Lett* 49:273-302.

- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25:677-686.

- Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology* 6:597-641.

- Mathewson AJ, Berry M (1985) Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain research* 327:61-69.

- Maxwell WL, Duance VC, Lehto M, Ashurst DE, Berry M (1984) The distribution of types I, III, IV and V collagens in penetrant lesions of the central nervous system of the rat. *The Histochemical journal* 16:1215-1229.

- Mecha M ML, Hernangómez M, Borrell J, Guaza C (2011) An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: a beginners approach. *Protocol Exchange* 218.

- Mission JP, Takahashi T, Caviness VS, Jr. (1991) Ontogeny of radial and other astroglial cells in murine cerebral cortex. *Glia* 4:138-148.

- Moreno JA, Radford H, Peretti D, Steinert JR, Verity N, Martin MG, Halliday M, Morgan J, Dinsdale D, Ortori CA, Barrett DA, Tsaytler P, Bertolotti A, Willis AE, Bushell M, Mallucci GR (2012) Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration. *Nature* 485:507-511.
- Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Wahl SM (1992) Cytokines and neuropathology. *Trends in pharmacological sciences* 13:286-291.
- Morgenstern DA, Asher RA, Fawcett JW (2002) Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Progress in brain research* 137:313-332.
- Nakka VP, Gusain A, Raghubir R (2010) Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Neurotoxicity research* 17:189-202.
- Ohri SS, Hetman M, Whittemore SR (2013) Restoring endoplasmic reticulum homeostasis improves functional recovery after spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 58:29-37.
- Park J, Ha H, Ahn HJ, Kang SW, Kim YS, Seo JY, Kim MS (2005) Sirolimus inhibits platelet-derived growth factor-induced collagen synthesis in rat vascular smooth muscle cells. *Transplant Proc* 37:3459-3462.
- Paxinos G, Franklin KB (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*: Gulf Professional Publishing.
- Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427-434.
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev* 94:1077-1098.
- Penas C, Guzman MS, Verdu E, Fores J, Navarro X, Casas C (2007) Spinal cord injury induces endoplasmic reticulum stress with different cell-type dependent response. *Journal of neurochemistry* 102:1242-1255.
- Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S (2004) Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of disease*

15:415-436.

- Proud CG (2007) Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *The Biochemical journal* 403:217-234.
- Prydz K, Dalen KT (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *Journal of cell science* 113 Pt 2:193-205.
- Pyka M, Wetzel C, Aguado A, Geissler M, Hatt H, Faissner A (2011) Chondroitin sulfate proteoglycans regulate astrocyte-dependent synaptogenesis and modulate synaptic activity in primary embryonic hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* 33:2187-2202.
- Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, Nomura Y (2004) Sodium 4-phenylbutyrate protects against cerebral ischemic injury. *Molecular pharmacology* 66:899-908.
- Raff MC, Miller RH, Noble M (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303:390-396.
- Ramon y Cajal S (1909-1911) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres*. Vol Ie II Maloine: Paris.
- Raposo C, Schwartz M (2014) Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia* 62:1895-1904.
- Rasband W (2011) ImageJ. US National Institutes of Health; Bethesda, Maryland, USA: 1997–2011. There is no corresponding record for this reference.
- Reid DW, Chen Q, Tay AS, Shenolikar S, Nicchitta CV (2014) The unfolded protein response triggers selective mRNA release from the endoplasmic reticulum. *Cell* 158:1362-1374.
- Reier PJ, Houle JD (1988) The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Advances in neurology* 47:87-138.
- Renault-Mihara F, Okada S, Shibata S, Nakamura M, Toyama Y, Okano H (2008) Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:1649-1653.

- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in neurosciences* 20:570-577.
- Rodrigues CM, Spellman SR, Sola S, Grande AW, Linehan-Stieers C, Low WC, Steer CJ (2002) Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22:463-471.
- Rodrigues CM, Sola S, Nan Z, Castro RE, Ribeiro PS, Low WC, Steer CJ (2003) Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:6087-6092.
- Rønn LC, Ralets I, Hartz BP, Bech M, Berezin A, Berezin V, Møller A, Bock E (2000) A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. *Journal of neuroscience methods* 100:25-32.
- Rubovitch V, Barak S, Rachmany L, Goldstein RB, Zilberstein Y, Pick CG (2015) The neuroprotective effect of salubrinal in a mouse model of traumatic brain injury. *Neuro-molecular medicine* 17:58-70.
- Sajad M, Zargan J, Chawla R, Umar S, Khan HA (2011) Upregulation of CSPG3 accompanies neuronal progenitor proliferation and migration in EAE. *J Mol Neurosci* 43:531-540.
- Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, Iwakura Y, Atsumi T, Shioda S (2012) Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Journal of neuroinflammation* 9:65.
- Saxena S, Cabuy E, Caroni P (2009) A role for motoneuron subtype-selective ER stress in disease manifestations of FALS mice. *Nature neuroscience* 12:627-636.
- Schachtrup C, Lu P, Jones LL, Lee JK, Lu J, Sachs BD, Zheng B, Akassoglou K (2007) Fibrinogen inhibits neurite outgrowth via beta 3 integrin-mediated phosphorylation of the EGF receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11814-11819.
- Schachtrup C, Ryu JK, Helmrick MJ, Vagena E, Galanakis DK, Degen JL, Mar-

golis RU, Akassoglou K (2010) Fibrinogen triggers astrocyte scar formation by promoting the availability of active TGF-beta after vascular damage. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30:5843-5854.

- Schwab JM, Beschoner R, Nguyen TD, Meyermann R, Schluesener HJ (2001) Differential cellular accumulation of connective tissue growth factor defines a subset of reactive astrocytes, invading fibroblasts, and endothelial cells following central nervous system injury in rats and humans. *Journal of neurotrauma* 18:377-388.

- Schwab JM, Postler E, Nguyen TD, Mittelbronn M, Meyermann R, Schluesener HJ (2000) Connective tissue growth factor is expressed by a subset of reactive astrocytes in human cerebral infarction. *Neuropathology and applied neurobiology* 26:434-440.

- Shen J, Ishii Y, Xu G, Dang TC, Hamashima T, Matsushima T, Yamamoto S, Hattori Y, Takatsuru Y, Nabekura J, Sasahara M (2012) PDGFR-beta as a positive regulator of tissue repair in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32:353-367.

- Shearer MC, Fawcett JW (2001) The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration? *Cell and tissue research* 305:267-273.

- Shechter R, Schwartz M (2013) CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends in molecular medicine* 19:135-143.

- Sherman LS, Back SA (2008) A 'GAG' reflex prevents repair of the damaged CNS. *Trends in neurosciences* 31:44-52.

- Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113:685-700.

- Silbert JE, Sugumaran G (2002) Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB life* 54:177-186.

- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews Neuroscience* 5:146-156.

- Smith-Thomas LC, Stevens J, Fok-Seang J, Faissner A, Rogers JH, Fawcett JW

(1995) Increased axon regeneration in astrocytes grown in the presence of proteoglycan synthesis inhibitors. *Journal of cell science* 108 (Pt 3):1307-1315.

- Soderblom C, Luo X, Blumenthal E, Bray E, Lyapichev K, Ramos J, Krishnan V, Lai-Hsu C, Park KK, Tsoulfas P, Lee JK (2013) Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:13882-13887.

- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119:7-35.

- Sokka AL, Putkonen N, Mudo G, Pryazhnikov E, Reijonen S, Khiroug L, Belluardo N, Lindholm D, Korhonen L (2007) Endoplasmic reticulum stress inhibition protects against excitotoxic neuronal injury in the rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:901-908.

- Streit WJ (2000) Microglial response to brain injury: a brief synopsis. *Toxicologic pathology* 28:28-30.

- Stoica BA, Faden AI (2010) Cell Death Mechanisms and Modulation in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7:3-12.

- Sundberg C, Ljungstrom M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K (1993) Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 143:1377-1388.

- Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery* 75:15-26.

- Trojanowska M (2008) Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford, England)* 47 Suppl 5:v2-4.

- Unsicker K, Flanders KC, Cissel DS, Lafyatis R, Sporn MB (1991) Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 44:613-625.

- Van Wagoner NJ, Benveniste EN (1999) Interleukin-6 expression and regulation

in astrocytes. *J Neuroimmunol* 100:124-139.

- Ventimiglia R, Jones BE, Møller A (1995) A quantitative method for morphometric analysis in neuronal cell culture: unbiased estimation of neuron area and number of branch points. *Journal of neuroscience methods* 57:63-66.

- Vertel BM, Velasco A, LaFrance S, Walters L, Kaczman-Daniel K (1989) Precursors of chondroitin sulfate proteoglycan are segregated within a subcompartment of the chondrocyte endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* 109:1827-1836.

- Vertel BM, Walters LM, Flay N, Kearns AE, Schwartz NB (1993) Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event. *The Journal of biological chemistry* 268:11105-11112.

- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society transactions* 34:7-11.

- Williams BR (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* 18:6112-6120.

- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994) Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347.

- Wu J, Yoo S, Wilcock D, Lytle JM, Leung PY, Colton CA, Wrathall JR (2010) Interaction of NG2(+) glial progenitors and microglia/macrophages from the injured spinal cord. *Glia* 58:410-422.

- Yanguas-Casas N, Barreda-Manso MA, Nieto-Sampedro M, Romero-Ramirez L (2014) Tauroursodeoxycholic acid reduces glial cell activation in an animal model of acute neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 11:50.

- Yin J, Sakamoto K, Zhang H, Ito Z, Imagama S, Kishida S, Natori T, Sawada M, Matsuyama Y, Kadomatsu K (2009) Transforming growth factor-beta1 upregulates keratan sulfate and chondroitin sulfate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain research* 1263:10-22.

- Yokota H, Hamamura K, Chen A, Dodge TR, Tanjung N, Abedinpoor A, Zhang P (2013) Effects of salubrinal on development of osteoclasts and osteoblasts from bone

marrow-derived cells. BMC musculoskeletal disorders 14:197.

- Yoshioka N, Hisanaga S, Kawano H (2010) Suppression of fibrotic scar formation promotes axonal regeneration without disturbing blood-brain barrier repair and withdrawal of leukocytes after traumatic brain injury. The Journal of comparative neurology 518:3867-3881.

- Yoshioka N, Kimura-Kuroda J, Saito T, Kawamura K, Hisanaga S, Kawano H (2011) Small molecule inhibitor of type I transforming growth factor-beta receptor kinase ameliorates the inhibitory milieu in injured brain and promotes regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons. Journal of neuroscience research 89:381-393.

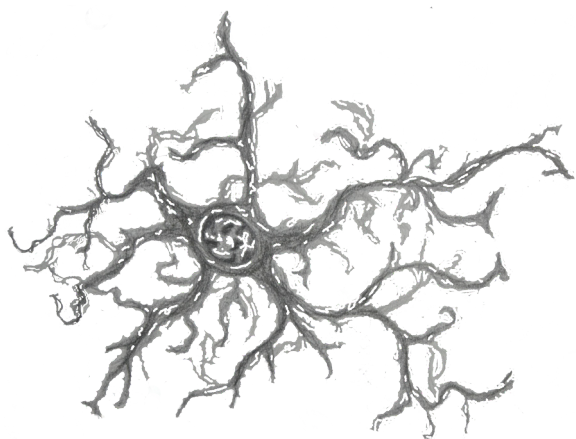
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA (2012) Genomic analysis of reactive astrogliosis. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 32:6391-6410.

- Zhang P, Hamamura K, Jiang C, Zhao L, Yokota H (2012) Salubrinal promotes healing of surgical wounds in rat femurs. Journal of bone and mineral metabolism 30:568-579.

- Zheng L, Ishii Y, Tokunaga A, Hamashima T, Shen J, Zhao QL, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Mori H, Kondo T, Sasahara M (2010) Neuroprotective effects of PDGF against oxidative stress and the signaling pathway involved. Journal of neuroscience research 88:1273-1284.

- Zhu Y, Fenik P, Zhan G, Sanfillipo-Cohn B, Naidoo N, Veasey SC (2008) Eif-2a protects brainstem motoneurons in a murine model of sleep apnea. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience 28:2168-2178.

- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT (2008) Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. Histochemistry and cell biology 130:635-653.



Anexos

Anexo I

Breve *curriculum vitae* de la doctoranda



INFORMACIÓN PERSONAL

Nombre: M^a Asunción de la Barreda Manso

Fecha de Nacimiento: 18/Marzo/1983

Nacionalidad: Española

Lugar de Residencia: Madrid (Madrid)

e-mail: mabarreda@gmail.com

FORMACIÓN ACADÉMICA

- Licenciada en Biología. Especialidad Biología Sanitaria. Universidad Complutense de Madrid. 2001-2007

- Curso Escuela de Biología Molecular ‘Eladio Viñuela’: De la Biomedicina básica a la clínica. Universidad Internacional Menéndez Pelayo. 2007

- Certificado de Aptitud Pedagógica (CAP). Universidad Complutense de Madrid. 2007-2008

- Acreditación para la utilización de Animales de Experimentación, categoría B. Universidad Complutense de Madrid. 2009

- Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina. Universidad Complutense de Madrid. 2010 - 2011

- Curso inglés científico nivel avanzado. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 2014

- Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina (en curso). Universidad Complutense de Madrid. 2011 - presente

EXPERIENCIA PROFESIONAL

- Prácticas Investigación. Museo de Ciencias Naturales, CSIC. Departamento Ecología Evolutiva. 2006 - 2007

- Técnico Investigador de laboratorio. Fundación Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM. Unidad de Neurología Experimental. Laboratorio Neurología Molecular. 2008 - 2009

- Estudiante de doctorado. Fundación Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Unidad de Neurología Experimental. Instituto Cajal, Neurobiología Funcional y de Sistemas, CSIC. Laboratorio Plasticidad Neural. Bajo la tutela de Lorenzo Romero Ramírez y Manuel Nieto Sampedro. 2009 - actualidad

PUBLICACIONES

- Romero-Ramírez L, García-Álvarez I, Casas J, **Barreda-Manso MA**, Yanguas-Casás N, Nieto-Sampedro M, Fernández-Mayoralas A. *New oley glycoside as anti-cancer agent that targets on neutral sphingomyelinase*. Biochem. Pharmacol. (submitted, under minor revision for publication).

- **Barreda-Manso MA**, Yanguas-Casás N, Nieto-Sampedro M, Romero-Ramírez L. *Salubrinal inhibits the expression of proteoglycans and favors neurite outgrowth from cortical neurons in vitro*. Exp Cell Res. 2015 Apr 13;335(1):82-90.

- Romero-Ramírez L, **Barreda-Manso MA**, Dámaso-Riquelme E, Yanguas-Casás N, Nieto-Sampedro M. *Pharmacological modulation of the glial scar for CNS injury repair*. Trauma. 2014 Dec 15; 25(4).

- Yanguas-Casás N, **Barreda-Manso MA**, Nieto-Sampedro M, Romero-Ramírez L. *Tauroursodeoxycholic acid reduces glial cell activation in an animal model of acute neuroinflammation*. J Neuroinflammation. 2014 Mar 19;11(1):50.

- García-Álvarez I, Groult H, Casas J, **Barreda-Manso MA**, Yanguas-Casás N, Nieto-Sampedro M, Romero-Ramírez L, Fernández-Mayoralas A. *Synthesis of antimitotic thioglycosides: in vitro and in vivo evaluation of their anticancer activity*. J Med Chem. 2011 Oct 13;54(19):6949-55.

CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

- Autores: M.A. Barreda Manso, N. Yanguas Casás, M. Nieto Sampedro, L. Romero Ramírez.

Título: Dual effect of Salubrinal in stab wound injury after a cortical lesion.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease

Lugar de celebración: Bilbao, España. Fecha: Julio 2015.

- Autores: N. Yanguas Casás, M.A. Barreda Manso, M. Nieto Sampedro, L. Romero Ramírez.

Título: TUDCA skews microglia towards M2 phenotype through the G-protein coupled bile acid receptor GPBAR1/TGR5.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease

Lugar de celebración: Bilbao, España. Fecha: Julio 2015.

- Autores: N. Yanguas Casás, M.A. Barreda Manso, M. Nieto Sampedro, L. Romero Ramírez.

Título: TUDCA switches activated microglia to M2 phenotype in a model of acute neuroinflammation.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 9th FENS Forum of Neuroscience

Lugar de celebración: Milán, Italia. Fecha: Julio 2014.

- Autores: N. Yanguas Casás, M.A. Barreda Manso, M. Nieto Sampedro, L. Romero Ramírez.

Título: TUDCA reduces microglial migratory capability both *in vitro* and *in vivo*.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: SfN's 44th annual meeting.

Lugar de celebración: San Diego, EEUU. Fecha: Noviembre 2013.

- Autores: M.A. Barreda Manso, N. Yanguas Casás, M. Nieto Sampedro, L. Romero Ramírez.

Título: Salubrinal regulates glial reactivity and fibrosis after a cortical lesion.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XV Congreso SENC.

Lugar de celebración: Oviedo, España. Fecha: Septiembre 2013.

- Autores: MA. de la Barreda Manso; N. Yanguas Casás; M. Nieto Sampedro; L. Romero Ramírez.

Título: Salubrinal modulates glial scar formation after a cortical lesion.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 8th FENS Forum of Neuroscience

Lugar de celebración: Barcelona, España. Fecha: Julio 2012.

- Autores: N. Yanguas Casás; MA. de la Barreda Manso; M. Nieto Sampedro; L. Romero Ramírez.

Título: TUDCA diminishes LPS induced microglial activation in mice hippocampus.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 8th FENS Forum of Neuroscience

Lugar de celebración: Barcelona, España. Fecha: Julio 2012.

- Autores: L. Romero Ramírez; MA. de la Barreda Manso; N. Yanguas Casás; M. Nieto Sampedro.

Título: A new method of synthesis for Neurostatin: a natural inhibitor of astrocyte and glioma proliferation.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: 8th FENS Forum of Neuroscience

Lugar de celebración: Barcelona, España. Fecha: Julio 2012.

- Autores: MA. de la Barreda Manso; N. Yanguas Casás; M. Nieto Sampedro; L. Romero Ramírez.

Título: Marcadores celulares de estrés del retículo en un modelo de lesión del sistema nervioso central.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XIV Congreso SENC.

Lugar de celebración: Salamanca, España. Fecha: Septiembre 2011.

- Autores: L. Romero Ramírez; MA. de la Barreda Manso; N. Yanguas Casás; M. Nieto Sampedro.

Título: Neurostatin, a natural inhibitor of astrocyte and glioma proliferation: a new method of synthesis.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: XIV Congreso SENC.

Lugar de celebración: Salamanca, España. Fecha: 28-30 Septiembre 2011.

- Autores: L. Romero Ramírez; MA. de la Barreda Manso; N. Yanguas Casás; M. Nieto Sampedro.

Título: A new method of synthesis for Neurostatin: a natural inhibitor of astrocyte and glioma proliferation.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: International Symposium on Clinical and Basic Investigation in Glioblastoma. II Symposium Seve Ballesteros Foundation.

Lugar de celebración: Valencia, España. Fecha: Junio 2011.

- Autores: L. Romero Ramírez; MA. de la Barreda Manso; N. Yanguas Casás; M. Nieto Sampedro.

Título: Neurostatin, a natural inhibitor of astrocyte and glioma proliferation: a new method of synthesis.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: Emergent therapies and translational research for spinal cord injury.

Lugar de celebración: Toledo, España. Fecha: Abril 2011.

Anexo II

Artículo original: “Salubrinal inhibits the expression of proteoglycans and favors neurite outgrowth from cortical neurons *in vitro*”

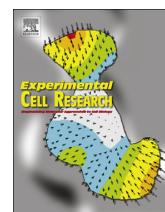
**Publicado en Exp Cell Res. 2015, Apr 13; 335(1):82-90.
doi: 10.1016/j.yexcr.2015.04.002.**



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr



Research Article

Salubrinal inhibits the expression of proteoglycans and favors neurite outgrowth from cortical neurons *in vitro*



M. Asunción Barreda-Manso^{a,b}, Natalia Yanguas-Casás^a,
Manuel Nieto-Sampedro^{a,b}, Lorenzo Romero-Ramírez^{b,*}

^aLaboratorio de Plasticidad Neural, Instituto Cajal (CSIC), Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain

^bLaboratorio de Plasticidad Neural, Unidad de Neurología Experimental, Hospital Nacional de Paraplégicos (SESCAM), Finca la Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 9 February 2015

Received in revised form

25 March 2015

Accepted 1 April 2015

Available online 13 April 2015

Keywords:

Astrocytes

CSPG

mRNA degradation

Neurite outgrowth

Salubrinal

Translation attenuation

ABSTRACT

After CNS injury, astrocytes and mesenchymal cells attempt to restore the disrupted *glia limitans* by secreting proteoglycans and extracellular matrix proteins (ECMs), forming the so-called glial scar. Although the glial scar is important in sealing the lesion, it is also a physical and functional barrier that prevents axonal regeneration.

The synthesis of secretory proteins in the RER is under the control of the initiation factor of translation eIF2 α . Inhibiting the synthesis of secretory proteins by increasing the phosphorylation of eIF2 α , might be a pharmacologically efficient way of reducing proteoglycans and other profibrotic proteins present in the glial scar. Salubrinal, a neuroprotective drug, decreased the expression and secretion of proteoglycans and other profibrotic proteins induced by EGF or TGF β , maintaining eIF2 α phosphorylated. Besides, Salubrinal also reduced the transcription of proteoglycans and other profibrotic proteins, suggesting that it induced the degradation of non-translated mRNA.

In a model *in vitro* of the glial scar, cortical neurons grown on cocultures of astrocytes and fibroblasts with TGF β treated with Salubrinal, showed increased neurite outgrowth compared to untreated cells. Our results suggest that Salubrinal may be considered of therapeutic value facilitating axonal regeneration, by reducing overproduction and secretion of proteoglycans and profibrotic protein inhibitors of axonal growth.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; CSPGs, chondroitin sulfate proteoglycans; CTGF, connective tissue growth factor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ECMs, extracellular matrix proteins; EGF, epidermal growth factor; FBS, Fetal bovine serum; P/S, Penicillin/Streptomycin; P-eIF2 α , eIF2 α phosphorylated; qPCR, quantitative real-time PCR; RER, rough endoplasmic reticulum; RPS29, 40S ribosomal protein S29; RT, room temperature; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, SDS-polyacrilamide gel electrophoresis; TBST, TBS with Tween 20; TGF β , transforming growth factor β ; XylT, Xylosyltransferases

*Correspondence to: Laboratorio de Plasticidad Neural, Instituto Cajal (CSIC). Avenida Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain.

E-mail address: lromeroramirez@sescam.jccm.es (L. Romero-Ramírez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.04.002>

0014-4827/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.